

GENERIERUNG UND ANALYSE EMA/E2F-6-DEFIZIENTER MÄUSE

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Michael Pohlers

geboren am 15. Mai 1973 in Karl-Marx-Stadt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckout, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Harald Saumweber

2. Prof. Dr. Christian Hagemeyer; PhD

3. Prof. Dr. Peter Daniel

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Dezember 05

Zusammenfassung

Die Kontrolle der Transkription ist ein wichtiger Schritt bei der regulierten Expression eines Gens. Das Ergebnis der Transkription eines proteinkodierenden Gens ist die Synthese der komplementären prä-mRNA zu einer bestimmten Zeit an einem bestimmten Ort im Organismus. Die Regulation der Transkription wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biologischen Funktionen des Transkriptionsfaktors EMA/E2F-6 untersucht. EMA/E2F-6 ist ein Mitglied der heterogenen E2F-Familie. E2F-Faktoren haben eine breite Rolle bei einer Vielzahl von bedeutenden zellulären Prozessen. Dazu gehören die Kontrolle von Regulatoren des G₁/S-Phase- und des G₂/M-Phase-Übergangs des Zellzyklus. Außerdem reguliert E2F die Expression von Genen, die in die DNA-Replikation, die DNA-Reparatur, die Mitose, die Apoptose und die Differenzierung eingebunden sind. Die E2F-Familie besteht sowohl aus aktivierenden als auch aus reprimierenden Mitgliedern. EMA/E2F-6 ist ein Repressor und hemmt die Transkription im Gegensatz zu E2F-1 bis E2F-5 nicht als E2F/Pocketprotein-Komplex, sondern es wurde als ein Bestandteil verschiedener großer Proteinkomplexe identifiziert. Bestandteile dieser repressorischen Komplexe sind Chromatin-modulierende Faktoren und mehrere Polycomb-Gruppe-Proteine wie Bmi-1, RING1 und EPC1. Man geht davon aus, dass EMA/E2F-6 diese multimeren Komplexe gezielt an die Promotoren bestimmter Gene rekrutiert. So ist EMA/E2F-6 an der Zellzyklus-abhängigen Regulation von E2F-Zielgenen beteiligt. Die Identifizierung von spezifischen EMA/E2F-6-Zielgenen weist andererseits darauf hin, dass EMA/E2F-6 Prozesse kontrolliert, die unabhängig vom pRb-Signaltransduktionsweg sind.

Um anhand von Defekten und Fehlentwicklungen EMA/E2F-6-defizienter Mäuse auf die biologischen Funktionen von EMA/E2F-6 schließen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels homologer Rekombination ein Teil des *EMA/E2F-6*-Gens in embryonalen Stammzellen deletiert und ein Translations-terminations-Signal eingefügt. Junge EMA/E2F-6-defiziente Mäuse waren frei von offensichtlichen Beeinträchtigungen. Adulte EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse dagegen entwickelten eine Lähmung hauptsächlich der Hinterbeine. Im Rückenmark und in bestimmten Arealen des Gehirns der Mäuse konnte eine massive Einwanderung von Makrophagen festgestellt werden, die von großen Gewebsläsionen begleitet war. Es handelte sich jedoch nicht um eine entzündliche Erkrankung, da infiltrierte T-Lymphozyten nicht beobachtet werden konnten. Die weitere Analyse zeigte primäre Demyelinisierungen von Axonen im zentralen und im peripheren Nervensystem. Die Demyelinisierung der Axone hatte den Untergang der betroffenen Neurone zur Folge. Außerdem war die Anzahl der myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems, der Oligodendrozyten, reduziert. Dagegen konnten die Veränderungen der Zellschichten im Kleinhirn, wie sie von Mäusen mit dem inaktivierten *Bmi-1*-Gen beschrieben sind, nicht in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen beobachtet werden. Posteriore Transformation von Wirbelkörpern, ebenfalls ein Merkmal Polycomb-Gruppe-Protein-negativer Mauslinien, war in EMA/E2F-6-defizienten Mäusen nicht signifikant erhöht. Dagegen hatten EMA/E2F-6^{-/-}-T-Lymphozyten nach einer Stimulation eine erniedrigte Proliferationsrate, wenn auch die Erniedrigung deutlich geringer als beispielsweise bei Bmi-1-negativen Lymphozyten war.

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten war die Proliferation von embryonalen EMA/E2F-6^{-/-}-Fibroblasten normal. Diese Eigenschaft spiegelte sich in der unveränderten Expression von E2F-Zielgenen wider, die an der Kontrolle der Proliferation und des Zellzyklus beteiligt sind. Eine Analyse des Expressionsmusters von EMA/E2F-6^{-/-}-Fibroblasten mittels der DNA-Mikroarray-Technologie zeigte jedoch, dass die Gene der α -Tubuline TUBA3 und TUBA7, die im Wildtyp nur im Hoden exprimiert werden, in diesen Zellen stark aktiviert

waren. *TUBA3* und *TUBA7* waren in allen Geweben EMA/E2F-6-defizienter Mäuse exprimiert und hatten somit ihre gewebspezifische Transkriptionskontrolle verloren. Die Promotoren beider Gene enthalten ein auch in den homologen Genen anderer Spezies identisches E2F-Element, das in Gelretardationsexperimenten von einem EMA/E2F-6/DP-1-Komplex gebunden wurde. Die Mutation des Elements führte zu einem deutlichen Anstieg der Promotoraktivität in transienten Transfektionsexperimenten. Diese Ergebnisse weisen auf eine direkte Rolle von EMA/E2F-6 bei der dauerhaften Repression von männlichen geschlechtsspezifischen Genen in somatischen Geweben hin.

Durch die Generierung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass EMA/E2F-6 eine notwendige Funktion für die Aufrechterhaltung der axonalen Myelinschichten im zentralen und peripheren Nervensystem hat. Dagegen ist die Anwesenheit von EMA/E2F-6 nicht für alle Polycomb-Gruppe-Protein-abhängigen Funktionen, so aber für die volle Proliferationskapazität von T-Lymphozyten, limitierend. EMA/E2F-6 ist außerdem notwendig für die Hemmung von verschiedenen männlichen geschlechtsspezifischen Genen in somatischen Geweben aber nicht für die Kontrolle von Zellzyklus-assoziierten E2F-Zielgenen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Der pRb-Signaltransduktionsweg | 5 |
| 1.2 Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren | 5 |
| 1.2.1 Die Rolle von E2F in Zellwachstum und Zellerhaltung | 5 |
| 1.2.2 Die Diversität der E2F-Familie | 8 |
| 1.2.3 EMA/E2F-6 | 11 |
| 1.3 Möglichkeiten und Grenzen gentechnisch veränderter Mauslinien | 13 |
| 1.3.1 Nullmutationen der <i>E2F</i> -Gene der Maus | 16 |
| 1.3.2 Kombinierte Nullmutationen von <i>E2F</i> und <i>pRb</i> | 24 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 25 |
| 2 Methoden und Materialien | 27 |
| 2.1 Zellkultur | 27 |
| 2.1.1 Präparation, Kultur und transiente Transfektion primärer embryonaler Mausfibroblasten | 27 |
| 2.1.2 Präparation und Kultur immunokompetenter Mauszellen | 27 |
| 2.1.3 Kultur, stabile Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen | 28 |
| 2.1.4 Kultur und transiente Transfektion von HeLa-Zellen | 29 |
| 2.2 Etablierung von EMA/E2F-6-defizienten Mäusen | 29 |
| 2.2.1 Superovulation von Weibchen und Isolation von Blastozysten | 29 |
| 2.2.2 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten | 30 |
| 2.2.3 Uterustransfer von Blastozysten | 30 |
| 2.2.4 Maushaltung | 30 |
| 2.2.5 Genotypisierung | 31 |
| 2.2.5.1 Isolation von genomischer DNA | 31 |
| 2.2.5.2 Genotypisierungs-PCR | 31 |
| 2.3 Tierexperimente | 31 |
| 2.3.1 Narkose und Tötung | 32 |
| 2.3.2 Perfundierung | 32 |
| 2.3.3 Skelettpräparation | 32 |
| 2.3.4 Rota-Rod-Untersuchung | 33 |
| 2.3.5 Fettreiche Diät | 33 |
| 2.4 Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 2.4.1 Southern-Hybridisierung | 34 |
| 2.4.2 Isolation von Gesamt-RNA | 34 |
| 2.4.3 <i>RNase Protection Assay</i> | 35 |
| 2.4.4 RT-PCR | 36 |
| 2.4.5 Immunoblot | 36 |
| 2.4.6 Gelretardationsexperiment | 37 |
| 2.4.7 Reportergen-Assays | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.8 | Rekombinante Mutagenese des <i>TUBA3</i> -Promotors in pGL3Basic- <i>TUBA3</i> | 38 |
| 2.4.9 | DNA-Mikroarray | 39 |
| 2.5 | Zellbiologische Methoden | 40 |
| 2.5.1 | Durchflusszytometrie | 40 |
| 2.5.2 | Färben von Immunozellen über ihre Oberflächenantigene | 40 |
| 2.5.3 | CFDA-SE-Proliferationsassay | 41 |
| 2.5.4 | Synchronisierung von MEF in der G ₀ -Phase des Zellzyklus | 42 |
| 2.5.5 | Gamma-Bestrahlung | 42 |
| 2.5.6 | MTT-Assay | 43 |
| 2.6 | Statistische Analyse | 43 |
| 2.7 | Oligonukleotide und Plasmide | 43 |
| 3 | Ergebnisse | 46 |
| 3.1 | Inaktivierung des <i>EMA/E2F-6</i> -Gens der Maus | 46 |
| 3.1.1 | Klonierung des <i>Targeting</i> -Vektors und Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone | 46 |
| 3.1.2 | Generierung <i>EMA/E2F-6</i> -defizienter Mäuse | 49 |
| 3.2 | Charakterisierung <i>EMA/E2F-6</i> -defizienter Mäuse | 51 |
| 3.3 | Der Verlust von <i>EMA/E2F-6</i> führt zu einem primären axonalen Schaden | 54 |
| 3.4 | Untersuchungen von <i>EMA/E2F-6</i> ^{-/-} -Mäusen auf Phänotypen Pc-G-Protein-defizienter Mäuse | 63 |
| 3.4.1 | Hämatopoetische Defekte | 63 |
| 3.4.2 | Transformationen von Wirbelkörpern | 66 |
| 3.5 | Identifizierung von <i>EMA/E2F-6</i> -Zielgenen | 66 |
| 3.5.1 | DNA-Mikroarray-Analyse | 66 |
| 3.5.2 | <i>EMA/E2F-6</i> ist für die Regulation klassischer E2F-Zielgene nicht notwendig | 72 |
| 3.5.3 | Analyse der <i>EMA/E2F-6</i> -abhängigen Transkriptionsregulation der Gene <i>TUBA3</i> und <i>TUBA7</i> | 75 |
| 4 | Diskussion | 80 |
| 4.1 | <i>EMA/E2F-6</i> hat eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Myelinscheiden | 80 |
| 4.2 | Eine Rolle von <i>EMA/E2F-6</i> in der Inaktivierung männlicher Keimbahngene in somatischen Zellen | 87 |
| 4.3 | Der Verlust von <i>EMA/E2F-6</i> hat einen milden Einfluss auf Polycomb-Protein-abhängige Funktionen | 90 |
| 5 | Referenzen | 92 |
| | Selbstständigkeitserklärung | 104 |
| | Lebenslauf | 105 |
| | Danksagung | 106 |

1 Einleitung

1.1 Der pRb-Signaltransduktionsweg

Untersuchungen, die die der zellulären Proliferation zu Grunde liegenden Mechanismen entschlüsseln sollen, sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Spätestens seit der Gründung des Deutschen Krebsforschungszentrums 1964 und dem Forschungsprogramm des US-amerikanischen Präsidenten Richard Nixon „War on Cancer“ von 1971, ist es von gesellschaftlichem Interesse, die Grundlagen der Entstehung von Tumoren zu verstehen, nicht zuletzt um die steigende Zahl der Erkrankten erfolgreich therapieren zu können. Das Retinoblastomprotein pRb ist 1971 der erste Tumorsuppressor gewesen, der beschrieben worden ist (Knudson, 2001). Das Produkt dieses Tumorsuppressorgens hemmt den Zellzyklus in der G₁-Phase und wirkt so der Entstehung unkontrolliert wachsender Tumorzellen entgegen (Sherr, 2004). Die Vererbung eines Fehlers in einer Kopie eines solchen Gens bringt eine stark erhöhte Empfänglichkeit (Prädisposition) für eine Krebserkrankung mit sich. pRb interagiert physisch mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (Morris and Dyson, 2001). Zu ihnen gehören die E2F, deren Aktivität für den Eintritt der Zelle in die S-Phase notwendig sind (Wu, et al., 2001). E2F kontrolliert unter anderem die Transkription von Komponenten des DNA-Stoffwechsels und der DNA-Replikation (Nevins, 2001; Trimarchi and Lees, 2002). Die Bindung von pRb an E2F bewirkt eine Hemmung der E2F-sensitiven Gene. Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von pRb durch die mitogenaktivierten Zyklin D-abhängige Kinasen CDK4 und CDK6 hebt die Hemmung auf. Auf diese Weise werden extrazelluläre Ereignisse mit dem molekularen Apparat verknüpft, der die Initiation der DNA-Replikation in Säugerzellen kontrolliert (Abb. 1). Der Verlust von pRb weicht diese Kontrolle auf, die Zellzyklusmaschinerie wird von den extrazellulären Signalen entkoppelt, und die Fähigkeit proliferierender Zellen, den Teilungszyklus zu verlassen, geht verloren.

Onkogene Signale wie Myc, adenovirales E1A und mutiertes Ras aktivieren den *INK4a/ARF*-Genlocus. Als Produkt wird der CDK-Inhibitor p16^{INK4A} gebildet. Er bindet CDK4 bzw. CDK6 (Abb. 1). Dies führt zum Dissoziieren des aktiven Zyklin D-CDK-Komplexes und folglich zu dessen Inaktivierung. pRb kann dann nicht phosphoryliert werden, und der Eintritt in die S-Phase wird verhindert (Sherr and Roberts, 1999). Der *INK4a/ARF*-Locus kodiert ein zweites – strukturell und funktionell nicht verwandtes – Protein: p14^{ARF} im Menschen und p19^{ARF} in der Maus (Quelle, et al., 1995). p14^{ARF} aktiviert das potente Tumorsuppressor-Protein p53 über die Hemmung des negativen p53-Regulators Mdm2. Durch diese Aktivierung wird der programmierte Zelltod (die Apoptose) oder der Inhibitor p21^{Cip1} der Zyklin-E-abhängigen Kinase CDK2 induziert (Sherr, 2001). CDK2 phosphoryliert neben CDK4 und CDK6 pRb in der späten G₁-Phase (Lundberg and Weinberg, 1998). Mutationen innerhalb des *INK4a/ARF*-Locus können durch die gleiche Lokalisation beider Leserahmen parallel die Funktionen von pRb und p53 beeinflussen. Generell sind Mutationen innerhalb des gesamten Signalnetzwerkes bei den meisten, wenn nicht allen, Tumoren des Menschen zu finden.

1.2 Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren

1.2.1 Die Rolle von E2F in Zellwachstum und Zellerhaltung

Die am intensivsten untersuchten und am besten verstandenen Zielfaktoren der Pocketproteine pRb, p107

und p130 sind Mitglieder der E2F-Familie. E2F repräsentiert eine Genfamilie von Transkriptionsfaktoren, deren Namensgebung sich historisch von der Fähigkeit von E2F-1 ableitet, ein Sequenzelement im adenoviralen *E2*-Promotor zu binden (Kovesdi, et al., 1987; La Thangue and Rigby, 1987; Yee, et al., 1987). Seither wurden jeweils 11 Proteine des Menschen und der Maus beschrieben, die von sieben Genen kodiert werden; von E2F-3, EMA/E2F-6 und E2F-7 sind zwei Spleißvarianten bekannt. Alle Mitgliedern gemeinsam ist die homologe DNA-Bindungsdomäne, die den direkten Kontakt zur Zielsequenz herstellt (Zheng, et al., 1999) (Abb. 2). E2F-1 bis E2F-6 binden die DNA als Heterodimer mit DP-1 oder DP-2. Im Gegensatz dazu wirken E2F-7 und E2F-8 als Homodimere (De Bruin, et al., 2003; Di Stefano, et al., 2003; Logan, et al., 2004). Die Pocketproteine binden E2F-1 bis E2F-5 und beeinflussen so deren Transkriptionsaktivität negativ.

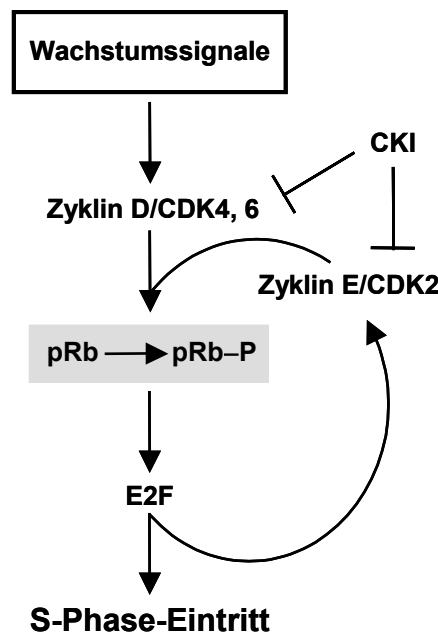


Abb. 1: **Der pRb/E2F-Signaltransduktionsweg, Fließschema.** Exogene Signale aktivieren Zyklin D-abhängige Kinasen, die pRb und die anderen Pocketproteine phosphorylieren. Es folgt eine Aktivierung E2F-vermittelter Genexpression, die zu einem Eintritt in die S-Phase führt. Unter den E2F-Zielgenen befinden sich Zyklin E und die damit assoziierte Kinase CDK2. Die Stimulierung der Zyklin E/CDK2-Aktivität durch E2F steigert die Inaktivierung der Pocketproteine und damit die E2F-Aktivität. CDK-Inhibitoren (CKI) hemmen die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen.

E2F spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation in Säugerzellen und wahrscheinlich vielen anderen eukaryotischen Zellen. Eine der prägenden Eigenschaften von E2F-1 bis E2F-5 und dE2F-1 aus *Drosophila* ist die Fähigkeit, bei Überexpression den Zellzyklus voranzutreiben. Die daraus resultierende Aktivierung der E2F-vermittelten Transkription führt die Zellen in die S-Phase (Asano, et al., 1996; Du, et al., 1996; Johnson, et al., 1993; Lukas, et al., 1996). Bei Überexpression von E2F-1 werden außerdem viele verschiedene Typen des Zellzyklusarrests, vermittelt durch Faktoren wie p16, p21, p27, γ -Strahlung, TGF β oder dominant-negatives CDK2, außer Funktion gesetzt (DeGregori, et al., 1995; DeGregori, et al., 1995; Johnson, et al., 1993; Lukas, et al., 1996; Mann and Jones, 1996; Schwarz, et al., 1995). E2F induziert die S-Phase, indem es die Expression von Genen steigert, deren Produkte am Eintritt der Zelle in die S-Phase und an der DNA-Synthese beteiligt sind. Offenbar eines der Schlüsselzielgene der Aktivierung der DNA-Replikation ist *Zyklin E*. So verursacht eine mutierte Form von pRb, der CDK-Phosphorylierungsstellen fehlen und von der angenommen

wird, so ein konstitutiver Inhibitor von E2F zu sein, in der Zellkultur eine Blockade des Zellzyklus. Diese Blockade kann aufgehoben werden, wenn man Zyklin E exogen zugibt (Lukas, et al., 1997).

Gesteigerte E2F-Aktivität führt nicht automatisch zu Zellproliferation. Überexpression von E2F-1 oder dE2F-1 löst in Primärzellen und vielen Zelllinien bei Abwesenheit proliferativer Signale eine starke Apoptoseantwort aus (Asano, et al., 1996; Du, et al., 1996; Kowalik, et al., 1995; Qin, et al., 1994; Shan and Lee, 1994; Wu and Levine, 1994). Apoptoseinduktion ist – zumindest *in vitro* - eine spezifische Eigenschaft von E2F-1. Überexprimiertes E2F-2 oder E2F-3 verursachen keine Apoptose, obwohl sie die Expression von E2F-Zielgenen induzieren und die Zellen in die S-Phase treiben können (DeGregori, et al., 1997). Das Auslösen von Apoptose ist nicht nur eine Reaktion auf E2F-1-Überexpression, sondern stellt generell eine wichtige Eigenschaft von E2F-1 dar, für die die Marked-Box-Domäne notwendig ist (Hallstrom and Nevins, 2003). E2F-1-negative Mäuse leiden an durch Apoptose verursachter Hyperplasie der Thymuszellen (Field, et al., 1996). Außerdem resultiert die Apoptose in pRb-negativen Embryonen zumindest teilweise von der Deregulation von E2F-1 (Tsai, et al., 1998). Bemerkenswert ist andererseits, dass die zusätzliche Inaktivierung von *E2F-3* die für pRb-negatives Nervengewebe charakteristische Apoptose vollständig aufhebt (Ziebold, et al., 2001). In vielen Zelllinien ist die E2F-1-vermittelte Apoptose abhängig von p53 (Kowalik, et al., 1995; Qin, et al., 1994; Wu and Levine, 1994). Daneben gibt es aber auch Bedingungen, in denen die Apoptose p53-unabhängig ist (Hsieh, et al., 1997; Macleod, et al., 1996; Morgenbesser, et al., 1994; Phillips, et al., 1997). Als mögliche Verbindung zwischen E2F und p53 wird p19^{ARF} gesehen. Neben einer p53-Stabilisierung durch Kontrolle der Mdm2-Aktivität aktiviert p19^{ARF} die p53-abhängige Transkription (Pomerantz, et al., 1998; Zhang, et al., 1998). Die p19^{ARF}-Transkription kann durch E2F-1-sensitive Bindungsstellen im p19^{ARF}-Promotor induziert werden (DeGregori, et al., 1997). Die apoptotische Aktivität von E2F-1 selbst wird durch die Kinase Akt reguliert (Hallstrom and Nevins, 2003).

Die Funktion von E2F ist die Regulation der Transkription bestimmter Gene. Diese sogenannten E2F-Zielgene wirken in vielen zellulären Prozessen mit. Unter ihnen sind gut beschriebene Zielgene wie die Regulatoren des Zellzyklus *Zyklin E*, *Zyklin A*, *cdc2* und *CDK2* (Botz, et al., 1996; Dalton, 1992; Furukawa, et al., 1994; Huet, et al., 1996; Ohtani, et al., 1995; Schulze, et al., 1995; Tommasi and Pfeifer, 1995). Andere Zielgene kodieren für Proteine mit Funktionen bei der DNA-Synthese bzw. -Replikation wie *DNA-Polymerase α* , *Thymidinkinase*, *DHFR*, mehrere *MCM*-Gene, und *cdc6* (Duronio, et al., 1998; Karlseder, et al., 1996; Leone, et al., 1998; Ogris, et al., 1993; Pearson, et al., 1991; Slansky and Farnham, 1996; Yan, et al., 1998). Die Fähigkeit von E2F-1, Apoptose zu induzieren, wird in Verbindung gebracht mit der Stimulation der Expression von p19^{ARF} (de Stanchina, et al., 1998; DeGregori, et al., 1997; Zindy, et al., 1998). Andere Untersuchungen lieferten Hinweise für eine durch E2F-1 vermittelte Induktion von Apoptose-relevanten Genen wie *Apaf1* (Moroni, et al., 2001), die *Caspasen 3, 7, 8, und 9* (Nahle, et al., 2002) sowie p73 (Irwin, et al., 2000).

Für die Analyse einer möglichen Regulation durch E2F wurden viele der Zielpromotoren im Voraus ausgewählt, weil bereits eine Verbindung zwischen ihnen und der DNA-Synthese oder eine Zellzyklus-Abhängigkeit bekannt gewesen ist. Ein ungerichteter Ansatz ist die in den letzten Jahren entwickelte DNA-Mikroarray-Technologie. Um neue E2F-sensitive Gene zu finden, wurden entweder Zellsysteme mit überexprimierten E2F (Ishida, et al., 2001; Muller, et al., 2001), eine Kombination von Chromatin-Immunpräzipitation mit DNA-Mikroarray (Ren, et al., 2002; Weinmann, et al., 2002) oder RNAi-behandelte Zellen (Dimova, et al., 2003) verwendet. Diese Analysen identifizierten viele Gene, die in bereits bekannten E2F-regulierten Prozessen involviert sind. Müller und Mitautoren beispielsweise konnten auch die Regulatoren der Apoptose *Apaf1* und die

Effektorcaspasen 3 und 7 als E2F-Zielgene bestätigen (Müller, et al., 2001). Übereinstimmend zwischen den Arbeiten war die Identifizierung von Genen, die Funktionen bei der DNA-Replikation und Zellzyklusprogression haben. Neben den bekannten Zielgenen finden sich aber auch Gruppen von Genen, die neue durch E2F-kontrollierte Zellprozesse darstellen. Dazu gehören Gene, die Homeobox- und Polycomb-Proteine kodieren sowie Komponenten der TGF β - und Wnt-Signalwege (Müller, et al., 2001). All diese Faktoren sind in der frühen Entwicklung eines Organismus wichtig. Ebenfalls eine bisher unbekannte, große Gruppe von E2F-Zielgenen spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur und in der Rekombination (Ren, et al., 2002; Weinmann, et al., 2002). Unbekannt waren bis dahin auch Zielfaktoren mit Funktionen bei den Zellzyklus-Kontrollpunkten der DNA-Schädigung und des mitotischen Spindelapparates (Ren, et al., 2002). Die Kontrolle von Prozessen während der Mitose ist auch insofern interessant, da E2F bisher nicht für Zellzyklus-Prozesse verantwortlich gemacht wurde, die in der G₂- oder der M-Phase stattfinden. Mögliche Funktionen von E2F während der Mitose werden durch neue potentielle Zielgene für Chromosomenkondensation und -segregation sowie für die Zytokinese unterstützt (Ishida, et al., 2001; Ren, et al., 2002). Diese Ergebnisse dienen als Anlass, die Promotoren solcher Gene zu untersuchen (Zhu, et al., 2004). Die Promotoren von *cdc2* und *Zyklin B1* enthalten ein positiv und ein negativ wirkendes E2F-Element. E2F-1, E2F-2 und E2F-3 binden das positive Element in der G₁-Phase und bis zum Ende der S-Phase und sind für die Genexpression während der G₂- und der M-Phase verantwortlich. E2F-4 bindet das negative Element in der Ruhephase (G₀) und reprimiert in dieser Zeit die Transkription. Die Spezifität, mit der die E2F die Bindungsstellen erkennen, wird durch ein benachbartes CAAT-Element für die aktivierenden E2F bzw. durch ein CHR-Element für das reprimierende E2F-4 erreicht.

Auffällig ist, dass viele Gene die Struktur oder die Funktion der DNA regulieren. So haben Weinmann und Mitautoren zusätzlich Histongene und Gene für die Chromatinumgestaltung identifiziert (Weinmann, et al., 2002). Beim Vergleich der in den einzelnen Studien identifizierten Zielgene fällt auf, dass es nur eine geringe Schnittmenge von Genen gibt. Übereinstimmung besteht allerdings bei den funktionellen Gruppen wie DNA-Replikation und -Rekombination. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Zellsysteme, die in den einzelnen Studien benutzt worden sind, verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse. Obwohl jeweils einige repräsentative Zielgene mit einer alternativen Methode bestätigt wurden, muss nachfolgend untersucht werden, welche Zielgene unter physiologischen Bedingungen Bestand haben.

1.2.2 Die Diversität der E2F-Familie

Ein E2F-Element in einem Promotor übt einen positiven oder negativen Einfluss auf die Transkription des Gens aus. Der Einfluss lässt sich mittels einer Mutationsanalyse bestimmen. So führt die Mutation der E2F-Bindungsstelle im *DHFR*-Promotor des Hamsters zu einem 80 %igen Aktivitätsverlust des Promotors (Blake and Azizkhan, 1989; Lam and Watson, 1993). Mutiert man die E2F-Bindungsstelle im *B-Myb*-Promotor, so steigt dessen Aktivität dagegen an (Blake and Azizkhan, 1989; Lam and Watson, 1993). Folglich aktiviert E2F den *DHFR*-Promotor, reprimiert aber den *B-Myb*-Promotor. Mit der C-terminalen Transaktivierungsdomäne ist E2F an sich ein Transkriptionsaktivator, über den Mechanismus ist aber wenig bekannt. So bindet E2F-1 den basalen Transkriptionsfaktor TBP *in vitro* und kann so die Bildung des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase II positiv beeinflussen (Emili and Ingles, 1995; Hagemeier, et al., 1993). Weitere biochemische Analysen zeigten, dass die Transaktivierungsdomäne von E2F-1 mit CBP wechselwirkt (Trouche and Kouzarides, 1996). Möglicherweise werden über diese Interaktion Histone im proximalen Promotor azetyliert

und so die Chromatinverpackung der DNA aufgelockert. Außerdem gibt es Überlegungen, die die Fähigkeit von E2F, den DNA-Strang zu krümmen, als transkriptionsaktivierend in Betracht ziehen (Cress and Nevins, 1996). Im Gegensatz dazu sind die Mechanismen der Repression durch E2F-Bindungsstellen besser verstanden. Auch die Repression wird durch Interaktionen von E2F mit anderen Proteinen erzielt. Die Faktoren E2F-1 bis E2F-5 bilden Komplexe mit den Pocketproteinen, die die Genexpression negativ beeinflussen, indem sie entweder Korepressorkomplexe an die DNA holen oder E2F an der Aktivierung der Transkription hindern. So kommt es bereits durch die bloße Protein-Protein-Interaktion zu einer sterischen Hinderung der Transaktivierungsdomäne (Hagemeier, et al., 1993). Die Mechanismen der aktiven Repression der Pocketproteine wurden von Morris und Dyson ausführlich diskutiert (Morris and Dyson, 2001). Die E2F-Proteine haben deutliche Präferenzen für einzelne Pocketproteine: E2F-1, E2F-2 und E2F-3 binden fast ausschließlich pRb; E2F-4 bindet mit hoher Affinität p107 und p130; und E2F-5 wechselwirkt mit p130 (Dyson, 1998). Das Vorkommen der einzelnen Komplexe ist auf bestimmte Phasen des Zellzyklus beschränkt (Dyson, 1998).

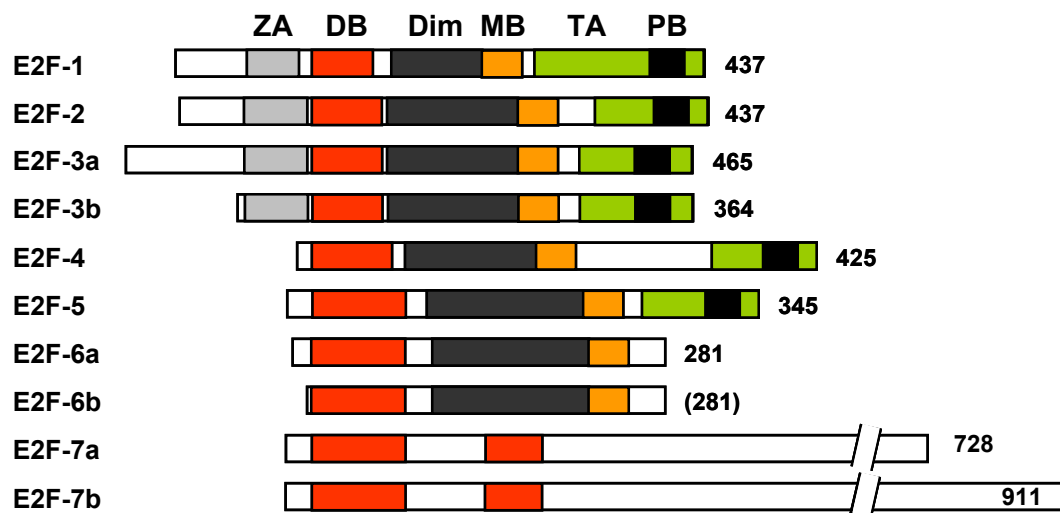


Abb. 2: **Schematische Darstellung des Domänenaufbaus der E2F-Proteine.** Die funktionell definierten und konservierten Sequenzmotive sind graphisch hervorgehoben. E2F-7 ist bisher nur wenig untersucht. Wir wissen, dass es zwei DNA-Bindungsdomänen besitzt, aber nicht mit DP und den Pocketproteinen wechselwirkt. Die Isoform E2F-6b ist bisher nur in der Maus als Protein nachgewiesen worden, obwohl auch humane alternative Transkripte existieren. Rechts ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben, in Klammern die der Mausproteine. Die Domänen sind wie folgt abgekürzt: ZA – Zyklus A-Bindung, MB – *Marked Box*, DB – DNA-Bindung, TA – Transaktivierung, Dim – Heterodimerisierung, PB – Pocketprotein-Bindung. Angelehnt an (Di Stefano, et al., 2003).

Anhand ihrer transkriptionellen Aktivität in Zellkulturexperimenten und den Strukturhomologien (Abb. 2) wird die E2F-Familie in Untergruppen eingeteilt. Obwohl E2F-1, E2F-2 und E2F-3 auch mit den Pocketproteinen – im Wesentlichen mit pRb – im Komplex nachweisbar sind, geht man davon aus, dass diese E2F hauptsächlich aktivierend auf die Genexpression wirken. Die Pocketproteine hemmen die Aktivität der E2F, und nach Dissoziation der Komplexe werden die Promotoren nicht nur dereprimiert, sondern von den an die DNA gebunden gebliebenen E2F aktiviert. Eine weitere E2F-Untergruppe wird von E2F-4 und E2F-5 gebildet, die mit p107 bzw. p130 in der G₀- und der frühen G₁-Phase des Zellzyklus wechselwirken und so überwiegend die Transkription hemmen. E2F-4 und E2F-5 besitzen zwar auch die Transaktivierungsdomäne, sind aber *in vitro* nur schwache Transkriptionsaktivatoren. Die letzte eher lose Untergruppe wird von EMA/E2F-6 und E2F-7

gebildet. Beide Proteine zeichnen sich durch das Fehlen der Pocketprotein-bindenden Domäne und der Transaktivierungsdomäne aus (De Bruin, et al., 2003; Di Stefano, et al., 2003; Morkel, et al., 1997). EMA/E2F-6 und E2F-7 sind somit ausschließlich Transkriptionsrepressoren. Die E2F-7-Sequenz ist nur schwach homolog zu den anderen E2F, die untereinander deutlich homologer sind. Anstelle der üblichen Dimerisierungsdomäne hat E2F-7 eine zweite DNA-Bindungsdomäne und ist damit den AtE2F aus *Arabidopsis thaliana* ähnlich (De Bruin, et al., 2003; Di Stefano, et al., 2003). Inzwischen ist die Entdeckung von E2F-8 beschrieben (Attwooll, et al., 2004). Die kombinierte Inaktivierung von mehreren *E2F*-Genen wurde bisher nur innerhalb der Untergruppen experimentell angegangen. Diese Arbeiten haben die funktionelle Überlappung einzelner E2F herausgearbeitet (siehe Kapitel 1.3.1). Da aber die kombinierte Inaktivierung von Genen aus mehreren E2F-Untergruppen noch aussteht, ist unbekannt, ob auch diese E2F funktionelle Redundanzen haben und somit diese Unterteilung der Proteinfamilie auf strukturelle Gemeinsamkeiten beschränkt bleiben muss.

Eine wichtige und bisher nur teilweise geklärte Frage ist die nach der Spezifität der einzelnen E2F: Haben die Familienmitglieder ein gemeinsames Set an Zielgenen, dass sie eventuell in Abhängigkeit von ihrer Expression während unterschiedlicher Bedingungen regulieren oder reguliert jedes E2F spezifische Promotoren und hat somit spezifische Funktionen? Der einzelnen Inaktivierung jedes *E2F*-Gens in der Maus folgt ein individuelles Spektrum phänotypischer Veränderungen im Tier (siehe Kapitel 1.3.1). Diese genbezogenen Defekte deuten auf eine funktionelle Spezifität der E2F hin. Dennoch ist es nur in einigen Mauslinien ansatzweise gelungen, die durch den Verlust eines E2F-Mitgliedes verursachte deregulierte Aktivität direkt zu benennen. So verursacht die Inaktivierung von *E2F-3* eine starke Verringerung der Proliferationsrate und der DNA-Synthese von MEF (Humbert, et al., 2000). Die Autoren konnten zeigen, dass die Expression einer Reihe von Genen *E2F-3*-abhängig ist. Unter diesen Genen sind welche, die bekannt sind für ihre Funktion während der DNA-Replikation und die Aufrechterhaltung des Nukleotidpools. Im direkten Vergleich ist die Expression dieser Gene nicht abhängig von E2F-1 (Humbert, et al., 2000). Obwohl das Gen unbekannt ist, dass die verstärkte Abgabe von Gehirnflüssigkeit und damit einen Hydrozephalus von *E2F-5*-defizienten Mäusen bewirkt, ist bekannt, dass *E2F-4* und *E2F-5* überlappend im Plexus choroidei exprimiert werden (Dagnino, et al., 1997; Lindeman, et al., 1998). Trotz dieser Überlappung ist das mit *E2F-5* in eine Untergruppe eingeteilte *E2F-4* nicht in der Lage, den *E2F-5*-Verlust zu kompensieren. In Mauslinien mit mehr als einem inaktivierten *E2F*-Gen wird die funktionelle Überlappung der E2F-Familienmitglieder deutlich. Alle bisher beschriebenen E2F-mehrfachmutierten Mauslinien zeigen Defekte, die in den Linien mit einem inaktivierten Gen nicht zu beobachten sind. Einige der Defekte sind so schwerwiegend, dass die Mäuse während der Embryonalentwicklung sterben. Daraus kann man ableiten, dass die verschiedenen E2F spezifische Zielgene haben, die nur teilweise von anderen E2F adäquat reguliert werden können. Die Situation in der Taufliege *Drosophila* ist besser zu überblicken, da sie nur zwei E2F-Mitglieder, dE2F-1 und dE2F-2, besitzt (Dynlacht, et al., 1994; Hao, et al., 1995; Ohtani and Nevins, 1994; Sawado, et al., 1998). Diese dE2F haben antagonistische Funktionen: dE2F-1 ist ein Aktivator der Transkription und dE2F-2 wirkt als Repressor, dessen Aktivität allerdings von der dE2F-1-Aktivierung überlagert werden kann (Frolov, et al., 2001). Die antagonistische Wirkung mündet in entgegengesetzten Effekten auf den selben Zielgenen (Frolov, et al., 2001). Ein weiteres Argument für die Spezifität der E2F-Familienmitglieder ist die E2F-1-spezifische Funktion, Apoptose auszulösen. Es erscheint plausibel, dass diese Fähigkeit durch die spezifische Transkriptionsaktivierung von Genen, die in den Apoptoseprozess eingebunden sind, vermittelt wird (DeGregori, et al., 1997).

Die strukturelle Homologie der DNA-Bindungsdomäne innerhalb der E2F-Familie setzt sich in ähnlichen funktionellen Eigenschaften fort. Alle E2F sind in der Lage zumindest bestimmte Zielpromotoren zu erkennen

(Ogawa, et al., 2002; Takahashi, et al., 2000). So bieten jene Untersuchungen einen Mechanismus an, die die spezifische Wechselwirkung einzelner E2F mit anderen Transkriptionsfaktoren beschreiben. Diese individuellen Komplexe diktiert dann eine Spezifität der Promotorerkennung bzw. die Unterscheidung einzelner E2F-Bindungsstellen. So wechselwirken offenbar nur E2F-2, E2F-3 und EMA/E2F-6 mit RYBP (Schlisio, et al., 2002; Trimarchi, et al., 2001). RYBP stellt eine physische Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor YY1 her. E2F-3 bindet außerdem den E-Box-Transkriptionsfaktor TFE3 (Giangrande, et al., 2003). In beiden Fällen, fallen diese Interaktionen mit der Fähigkeit der Proteine zusammen, die Transkription der Zielgene zu aktivieren, die sowohl E2F-Bindungsstellen als auch YY1- oder E-Box-Elemente enthalten. Interessanterweise werden diese Proteinwechselwirkungen von der Marked-Box-Domäne von E2F vermittelt (Giangrande, et al., 2003; Schlisio, et al., 2002; Trimarchi, et al., 2001). Bisher konnte der Marked-Box-Domäne keine direkte Funktion zugeordnet werden. Außer E2F-7 haben die anderen E2F diese Domäne und so ist möglicherweise deren Aufgabe, spezifische Proteinwechselwirkungen herzustellen. Der *E2F-1*-Promotor selbst hat zwei E2F-Bindungsstellen und ist ein Beispiel dafür, wie unterschiedliche E2F-Faktoren unterschiedliche Aktivitäten an einem Promotor bereitstellen (Araki, et al., 2003). Ein Komplex bestehend aus E2F-4 und p130 bindet eine Bindungsstelle in der G₀-Phase des Zellzyklus und reprimiert so den Promotor. Die andere Bindungsstelle wird von E2F-1 und E2F-3 erkannt und vermittelt die Promotoraktivierung. Eine ähnliche Situation wurde im vorherigen Kapitel für *cdc2* und *Zyklin B* beschrieben (Zhu, et al., 2004).

Erwähnenswert ist, dass mittels DNA-Mikroarray auch der Einfluss von verschiedenen E2F auf die Expression von einzelnen Zielgenen verglichen wurde (Ishida, et al., 2001; Müller, et al., 2001; Ren, et al., 2002). In den Untersuchungen konnte keine strikte Genspezifität nachgewiesen werden, obwohl es Unterschiede in der Stärke der Regulation gibt. Dieses Ergebnis steht mit einer weiteren Veröffentlichung im Einklang, die über Chromatin-Immunpräzipitation zeigt, dass die E2F ein gemeinsames Set an Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Zellzyklus binden (Takahashi, et al., 2000). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen für und wider einer Zielgenspezifität bleibt bestehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Methoden DNA-Mikroarray-Analyse und Chromatin-Immunpräzipitation nicht geeignet sind, subtile Unterschiede bei der individuellen Genregulation aufzulösen. Solche Unterscheidungen können wahrscheinlich nur nach der Interpretation von *in vivo*-Befunden gemacht werden. Für die E2F-Spezifität sprechen die wachsende Anzahl der diesbezüglichen Publikationen und deren Stringenz. Durch die vergleichsweise geringe Komplexität in *Drosophila* mit je nur zwei E2F- und Pocketprotein-Vertretern ist gelungen, den E2F unterschiedliche und nicht überlappende Gruppen an Zielgenen zu zuordnen (Dimova, et al., 2003).

1.2.3 EMA/E2F-6

Die Klonierung von EMA/E2F-6 wurde 1997 erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Morkel, et al., 1997). Die initiale Charakterisierung ergab, dass EMA/E2F-6 eine transferierbare Repressordomäne besitzt und sich somit sowohl strukturell als auch biochemisch von allen anderen E2F unterscheidet. Es besteht zwar wie E2F-1 bis E2F-5 aus DNA-Bindungs- und Heterodimerisierungsdomäne sowie einer Marked Box, wirkt aber wie E2F-7 aufgrund der fehlenden C-terminalen Domänen als Pocketprotein-unabhängiger Repressor. Anhand dieser Daten wurde der Faktor als „E2F-Bindungsstelle-modulierende Aktivität“ (EMA) benannt (Morkel, et al., 1997).

Obwohl EMA/E2F-6 im Organismus ubiquitär exprimiert wird, schwanken die Expressionshöhen teilweise

beträchtlich. In Skelettmuskel und im Herz ist das Transkript am stärksten (Cartwright, et al., 1998; Gaubatz, et al., 1998; Kherrouche, et al., 2001; Storre, et al., 2002; Trimarchi, et al., 1998). In vielen Zelllinien einschließlich embryonalen Stammzellen der Maus ist EMA/E2F-6 ebenfalls detektierbar (Cartwright, et al., 1998; Trimarchi, et al., 1998) (E. Miska, persönliche Mitteilung). Interessanterweise ist die Zelllinie NIH3T3 die einzige bekannte Ausnahme, in der sich keine EMA/E2F-6-mRNA nachweisen läßt (Cartwright, et al., 1998; Palena, et al., 2000). Während der Embryogenese der Maus ist EMA/E2F-6 bereits ab einem frühen Stadium exprimiert (Kherrouche, et al., 2001; Palena, et al., 2000). Im Gegensatz zu den anderen E2F ist die Expression von EMA/E2F-6 nicht Zellzyklus-reguliert (Kherrouche, et al., 2001). Die Expressionsdaten stehen mit den Eigenschaften des EMA/E2F-6-Promotors in Einklang. So weisen der hohe GC-Gehalt von ca. 70 % und die funktionelle Sp1-Bindungsstelle auf eine Transkriptionsregulation hin, wie sie üblicherweise in Genen gefunden werden, die für die Grundversorgung der Zelle notwendige Proteine kodieren (Finkbeiner, 1998; Kherrouche, et al., 2001).

Die DNA-Bindungsdomäne ist innerhalb der E2F-Familie die am stärksten konservierte Domäne (Morkel, et al., 1997). So überrascht es nicht, dass EMA/E2F-6 die aus dem adenoviralen *E2*-Promotor bekannte E2F-Konsensussequenz TTTTCGCGC erkennt. Sowohl ein DNA-Bindungsselektions-Experiment als auch die direkte Konkurrenz im Gelretardations-Experiment haben aber gezeigt, dass EMA/E2F-6 affiner für die Nukleotidfolge TTTCCCGC *in vitro* ist (Morkel, 1999; Sedlarz, 2004). Ogawa und Mitautoren haben mittels Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt, dass EMA/E2F-6 bekannte E2F-regulierte Promotoren bindet (Ogawa, et al., 2002). Diese Daten deuten an, dass EMA/E2F-6 auf diese Weise in den pRb-Signalweg integriert sein könnte. Dazu abweichend ist das Ergebnis aus einer Chromatin-Immunpräzipitation gekoppelt mit einem DNA-Mikroarray (Oberley, et al., 2003). In diesem Ansatz sind keine „klassischen“ E2F-Zielgene dereguliert, aber dennoch Gene, die Funktionen in bekannten E2F-regulierten Prozessen wie Tumorsuppression und Chromatinzusammensetzung haben.

EMA/E2F-6 ist ein transkriptionaler Repressor, der als Komponente verschiedener Multiproteinkomplexe wirkt (Attwooll, et al., 2004; Ogawa, et al., 2002; Trimarchi, et al., 2001). Als ein direkter Interaktionspartner wurde RYBP identifiziert, der in dieser Analyse innerhalb der E2F-Familie ausschließlich mit EMA/E2F-6 wechselwirkt (Trimarchi, et al., 2001). Andere Untersuchungen zeigen aber, dass auch E2F-2 und E2F-3 RYBP binden können (Schlisio, et al., 2002). In diesem Komplex befinden sich außerdem mehrere Polycomb (Pc-G)-Proteine wie Bmi1-1, Mel-18, RING1 und RING2. Sie gehören zur Klasse II der Polycomb-Repressorkomplexe (PRC), die für eine stabile Erhaltung der Repression auf Chromatinebene in Säugern und in *Drosophila* notwendig sind. Sie reprimieren unter anderem die entwicklungsbiologisch bedeutsamen *Hox*-Gene. Die Inaktivierung der Genen dieser Pc-G-Proteine führt zu Transformationen des gesamten Axenskeletts und defekter Hämatopoese infolge deregulierter *Hox*-Expression (Jacobs and van Lohuizen, 2002). Dass EMA/E2F-6 eine Komponente Pc-G-haltiger Komplexe ist, wird teilweise durch den Phänotyp EMA/E2F-6-defizienter Mäuse unterstützt (siehe Kapitel 2.1). Außer Pc-G-Proteine wurden im Komplex mit EMA/E2F-6 die Methyltransferasen Eu-HMTase1 und NG36/G9a gefunden, die das Lysin an Position 9 des N-terminalen Schwanzes von Histon H3 methylieren (Ogawa, et al., 2002). Weiter wurde der Repressor HP1 γ identifiziert, der speziell dieses methylierte Lysin bindet und so eine Langzeitinaktivierung der Transkription von Euchromatin bewirkt. Überraschenderweise wurde, mit dem Dimer Max/Mga neben EMA/E2F-6 eine zweite spezifische DNA-Bindungsaktivität in dem Komplex gefunden. Max/Mga binden E-Boxelemente, wie sie in Myc-DNA-Bindungsstellen zu finden sind. Da der Komplex Promotoren bekannter E2F-regulierter Gene ausschließlich in der

G₀-Phase bindet (Ogawa, et al., 2002), wurde folgendes Model einer EMA/E2F-6-abhängigen Transkriptionsregulation entworfen (La Thangue, 2002): Der Chromatin-modifizierende Komplex bindet während der G₀-Phase Promotoren, die EMA/E2F-6- und/oder Myc-Bindungsstellen haben und inaktiviert diese durch Methylierung von Lysin 9 des Histons H3. In der G₁-Phase wird dieser Komplex durch einen neuen Repressorkomplex, bestehend aus anderen E2F-Mitgliedern assoziiert mit Pocketproteinen, ersetzt. Dieser Komplex zerfällt am G₁/S-Phase-Übergang und die S-Phase-spezifischen Gene werden transkribiert.

Das Pc-G-Protein EPC1 wurde als Brücke von EMA/E2F-6 zu einem anderen Komplex gefunden, der zusätzlich das Pc-G-Protein EZH2 und Sin3B enthält und nur in proliferierenden Zellen existiert (Attwooll, et al., 2004). Da EZH2 zur Klasse I der PRC gehört und spezifisch für die Zellproliferation ist, unterscheidet sich dieser Komplex entscheidend von dem von Ogawa und Mitautoren beschriebenen. Klasse I PRC sind im Gegensatz zur Klasse II für die Initiation der Repression notwendig, aber es sind noch keine Zielgene dieses EMA/E2F-6-Komplexes beschrieben.

Die Expressionsregulation beschriebener E2F-Zielgene durch EMA/E2F-6 ist kürzlich bestätigt worden (Giangrande, et al., 2004). Demnach bindet EMA/E2F-6 nur E2F-regulierte Promotoren, die am G₁/S-Phase-übergang aktiviert werden wie *Thymidinkinase*, *Thymidylatsynthetase*, *Ribonukleotidreduktase* und *DNA-Polymerase α* , aber nicht jene Promotoren, die am G₂/M-Phasenübergang reguliert werden. EMA/E2F-6 bindet die Promotoren sehr spezifisch während der S-Phase. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Ogawa und Mitautoren (Ogawa, et al., 2002) die gezeigt haben, das EMA/E2F-6 in der Ruhephase mit der DNA assoziiert ist, konnte nicht aufgelöst werden.

Durch alternatives Spleißen können zwei EMA/E2F-6-Transkripte gebildet werden (Dahme, et al., 2002; Kherrouche, et al., 2001). Das alternative Exon 2 fügt ein Translationsterminations-Signal und an seinem 3'-Ende eine neues Start-Kodon in den Leserahmen ein. Als Ergebnis entsteht eine N-terminal verkürzte EMA/E2F-6-Isoform (E2F-6b), die sonst identisch mit der längeren Form (E2F-6a) ist. Allerdings wurde bisher nur in Mauszellen und nicht in menschlichen Zellen das E2F-6b-Protein detektiert (Dahme, et al., 2002) (M. Truß, persönliche Mitteilung). Interessant ist, dass die Menge der Transkripte je nach Gewebe und Zellstadium in verschiedenen Verhältnissen zueinander vorliegen (Dahme, et al., 2002; Kherrouche, et al., 2001). Über die Regulation des EMA/E2F-6-Spleißens und mögliche Funktionen von E2F-6b sind keine Daten bekannt.

1.3 Möglichkeiten und Grenzen gentechnisch veränderter Mauslinien

Mittlerweile sind es Routinemethoden, mit denen man in Zellen zusätzliche Gene einfügen und diese überexprimieren oder auch abschalten kann. Aktuell ist mit der Entwicklung der siRNA-Technologie eine einfach zu gebrauchende und schnelle Methode zum Verringern der Expressionshöhe bis hin zur dauerhaften Eliminierung aller Transkripte hinzugekommen (McManus and Sharp, 2002). Diese Methoden leisten einen großen Beitrag für das Verständnis regulatorischer Systeme, für Krankheitsmodelle und für die Entwicklungsbiologie. Zellkulturtechniken erlauben Aussagen über einzelne Zellen in einem vom Gesamtorganismus herausgelösten Zustand. Die standardisierten Experimentalbedingungen und deren gerichtete Manipulation sind ein wesentlicher Vorteil der *ex vivo*-Systeme. Allerdings können die Aussagen nicht in jedem Fall generalisiert werden. Ein Organismus reagiert auf das Fehlen oder Überexprimieren eines Gens unter Umständen anders als unter Zellkulturbedingungen.

Während der vergangenen zwei Jahrzehnte ist die Maus zum herausragenden Modelorganismus avanciert aus zwei Hauptgründen: Erstens ist die Maus ein Säugerorganismus mit vielen physiologischen, anatomischen und metabolischen Parallelen zu uns Menschen. Auf einen vordergründigen Blick sind die anatomischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch enorm, aber sie liegen vielmehr in nebensächlichen Eigenschaften wie Größe und Körperform. Dahingegen haben Organe, Gewebe und Zellen viele Ähnlichkeiten, die eine Vergleichbarkeit der Organsysteme, physiologischer Homöostase, Verhalten und Erkrankungen erlauben. Die Maus ist der geeignetste Ersatz zur Erforschung der Biologie des Menschen, und die Krankheitsverläufe in diesem Tier können detailliert die entsprechende Situation im Menschen widerspiegeln.

Obwohl es neben der Maus andere Organismen gibt, um die Säugetierbiologie zu studieren, und diese in einigen Fällen näher am Menschen sind, gibt es *pro* Maus einen weiteren Grund: Die genetische Manipulierbarkeit wurde nur für die Maus zu einer solchen Perfektion entwickelt. Die kontinuierliche Vervollständigung des Mausgenoms und vor allem die öffentliche Verfügbarkeit haben bereits jetzt, kurze Zeit nach ihrer Veröffentlichung, einen großen Innovationsschub für die Forschung gebracht (Consortium, 2002). Die Genome beider Organismen sind sich sehr ähnlich. Für weniger als 1% der potentiellen Mausgene kann zur Zeit kein Homolog im menschlichen Genom aufgespürt werden (und umgekehrt). Genetische Studien werden vereinfacht durch die Verfügbarkeit vieler seit langem etablierter Inzuchtstämme. Das homogene Genom eines Inzuchtstammes ermöglicht erst die Messung experimenteller Parameter.

Palmiter und Mitarbeitern gelang es 1982 erstmals mit der Einfügung eines Wachstumshormons in die Keimbahn einer Maus, die Gentransfertechnologie für einen hochentwickelten Organismus zu optimieren (Palmiter, et al., 1982). Um ein transgenes Tier zu erzeugen, wird das Genkonstrukt in einen der beiden Vorkerne einer Zygote mikroinjiziert. Das Genkonstrukt beinhaltet das Gen unter der Kontrolle des eigenen oder eines fremden Promotors und eine PolyA-Sequenz. Das Konstrukt wird in einer nicht vorhersehbaren Stelle ins Genom integriert. Die Embryonen werden in den Uterus einer vorbereiteten Amme transferiert und von dieser ausgetragen. Einige Nachkommen integrierten das Transgen in die Keimbahn. Mit diesen Mäusen kann eine transgene Linie aufgebaut werden, da das Transgen den Mendelschen Regeln folgend vererbt wird. Erst mit Hilfe der Transgentechnologie war es möglich, wesentliche Aspekte der Genregulation zu verstehen. Eine herausragende Rolle spielen auch Mäuse mit immunrelevanten Transgenprodukten, da es mit ihnen erst möglich gewesen ist, die Funktion der Transplantationsantigene richtig zu verstehen. Die positive und negative Selektion von T-Zellen als Mechanismen der Regulation der zellulären Immunantwort konnte ebenfalls mittels transgener Mauslinien aufgeklärt werden (Huang, 1993; Hurford, et al., 1997; Nossal, 1991; Viney, 1994). Die größte Bedeutung haben transgene Modelle allerdings bei der Erforschung genetisch bedingter Krankheiten. Mit ihrer Hilfe kann das betroffene Gen einwandfrei identifiziert werden.

Das funktionelle Inaktivieren eines Gens in der Keimbahn kann ebenfalls einen entscheidenden Beitrag für das Verständnis von Erkrankungen liefern. Andererseits beantworten diese sogenannten Nullmutationen auch viele Fragen der Grundlagenforschung. Die Isolierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) (Evans and Kaufman, 1981) und die Demonstration, dass diese sich zu Keimbahnzellen entwickeln können (Bradley, et al., 1984) waren die beiden entscheidenden Entdeckungen, die 1987 zur ersten Protein-defizienten Mauslinie führten (Kuehn, et al., 1987). Inzwischen sind einige Tausend Gene beschrieben, die mittels dieser Technologie in der Maus mutiert wurden. Dies entspricht einem Anteil von 10 – 15 % der vorausgesagten Anzahl der Mausgene. Es ist davon auszugehen, dass die Rate neuer Mauslinien jetzt deutlich steigt gerade auch durch die Kenntnis der DNA-Sequenz. Knight und Abbott haben eindrücklich die Probleme beschrieben, die Zehntausende Mauslinien

mit sich bringen (Knight and Abbott, 2002). Die Autoren gehen davon aus, dass man durchschnittlich fünf nutzbringende Linien pro Gen benötigt, um die Genfunktion erschöpfend charakterisieren zu können.

Um eine Nullmutation zu erzeugen, werden pluripotente ES-Zellen *in vitro* mit einem Genkonstrukt transfiziert. In seltenen Fällen wird durch homologe Rekombination der bestimmte Genabschnitt zwischen Genom und Vektor ausgetauscht. Diese veränderten ES-Zellen werden in als Blastozysten bezeichnete 3,5 Tage alte Embryonen injiziert. Die Blastozysten werden, ähnlich der Transgentechnologie, in ein Ammentier transferiert, das die fremden Nachkommen austrägt. Es werden zum Teil chimäre Mäuse geboren, die sich sowohl aus den Wildtypzellen des Embryos als auch aus den injizierten ES-Zellen entwickelt haben. Wiederum ein Teil der Chimären besitzt Keimzellen, die aus den ES-Zellen hervorgegangen sind. Dadurch kann die eingefügte Mutation an die Nachkommen weitergegeben und eine Mauslinie gezüchtet werden. Sind beide Allele des Gens durch Kreuzung heterozygoter Eltern inaktiviert (Homozygotie), fehlt das Genprodukt im gesamten Organismus. Diese Situation erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion des Gens im Organismus. Neben der Analyse, wie sich der Verlust eines Faktors auf den Organismus auswirkt, können mit dieser Methode auch die Funktion von Proteindomänen bis hin zu einzelnen Aminosäuren untersucht werden (Gau, et al., 2002; Reichardt, et al., 1998). In diesen Fällen wird das Gen nicht inaktiviert, sondern der entsprechende kodierende Abschnitt deletiert oder mutiert. Auch das andere Extrem einer Sequenzmodifikation ist möglich, nämlich die Deletion oder Duplikation von Millionen von Basenpaaren (Ramirez-Solis, et al., 1995).

Die Einschränkung der Technologie besteht darin, dass eine phänotypische Ausprägung nur in jenen Organen oder Geweben auftritt, in denen die Funktion des Gens limitierend ist. In anderen Fällen kann es zu funktioneller Überlappung von Genen kommen. Funktionelle Überlappung beinhaltet sowohl genetische Redundanz als auch funktionelle Kompensation. Mit genetischer Redundanz ist gemeint, dass, wenn in einem Gewebe mehr als ein Familienmitglied exprimiert wird, mehrere Gene inaktiviert sein müssen, um das entwicklungsbiologische Programm zu unterbrechen. Dies kann auftreten, wenn die Familienmitglieder die selbe molekulare Funktion tragen aber auch bei unterschiedlichen Aktivitäten, die dennoch den gleichen biologischen Prozess betreffen. Die Interpretation von Nullmutanten wird weiter kompliziert durch eine mögliche funktionelle Kompensation der Familienmitglieder untereinander. Funktionelle Kompensation ist komplexer und kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: (1) die Überexpression oder die Expression an einem neuen Ort eines zweiten Familienmitgliedes, dass jetzt eine Funktion bekommt, die es normalerweise nicht hat oder (2) die Induktion von nachfolgenden Ereignissen (*downstream*), die zu einer Kompensation durch Aktivierung eines alternativen Signalweges führt. Beispielsweise wurden E2F-Bindungsstellen in den Promotoren von *pRb*, *p107*, *E2F-1* und *E2F-2* gefunden; die Expressionssteigerung von p107 in pRb-negativen Zellen kann ein Beispiel funktioneller Kompensation innerhalb der Pocketprotein-Familie sein (Classon, et al., 2000; Hurford, et al., 1997; Mulligan, et al., 1998; Schneider, et al., 1994). Diesen funktionellen Überlappungen kann mittels Doppel- oder gar Dreifach-Nullmutationen entgegen gesteuert werden. Allerdings erhöht sich hierbei die Wahrscheinlichkeit embryonaler Letalität. Auch hier ist die Pocketprotein-Familie ein sehr gut untersuchtes Beispiel: Keimbahninaktivierung bereits von zwei der drei Familienmitglieder in jeder Kombination führt zum Tod während der Embryogenese oder kurz nach der Geburt (Classon and Dyson, 2001). In diesen Fällen kann einerseits die limitierende(n) Funktion(en) der Familie durch Analyse der Embryonen bestimmt werden, und zweitens stehen embryonale Mausfibroblasten (MEF) für vielgestaltige Zellkulturexperimente zur Verfügung. So wurde anhand der Charakterisierung der MEF, die für die gesamte Pocketprotein-Familie defizient sind, gezeigt, dass es eine signifikante funktionelle Überlappung der Pocketproteine gibt, deren koordiniertes Zusammenspiel die Kontroll-

mechanismen der Zellproliferation sichert. (Dannenberger, et al., 2000; Sage, et al., 2000). Diese Zellkulturanalysen verdeutlichen, welches Potential in der Synergie zwischen Tierexperiment und Zellkulturanalyse steckt.

Viele Gene, die eine entscheidende Funktion während der Embryonalentwicklung haben, sind – homozygot inaktiviert – embryonal letal. Mit diesen Mauslinien können zusätzliche Genfunktionen, die in einem entwicklungszeitlich späteren Zeitpunkt notwendig sind, nicht analysiert werden. Dieses Problem kann mit einer konditionale Nullmutation in einer neu zu erzeugenden Mauslinie überwunden werden. Dazu wird das Gen nur in einem bestimmten Organ, Gewebe oder Zellverband promotorabhängig inaktiviert. Damit kann der frühe Tod der homozygoten Mäuse überwunden werden. Allerdings müssen in Abhängigkeit von den Expressionsorten des Gens mehrere solche konditionale Mauslinien generiert werden, um zu einem Gesamtbild der Genfunktion zu gelangen.

Die kompensatorischen Mechanismen wirken auch in Zellen, die *ex vivo* analysiert werden. Allerdings bietet die Zellkultur den Vorteil ihrer kurzfristigen Manipulation. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen nicht oder nur teilweise in der Lage sind, die kompensatorischen Mechanismen in sehr kurzen Zeiträumen zu aktivieren. Diese Eigenschaft wurde kürzlich für pRb-negative MEF elegant gezeigt (Sage, et al., 2003). Die Autoren erzeugten ein konditionales Allel des *pRb*-Gens in ES-Zellen. MEF aus den daraus gewonnen Mäusen wurden mit einem Adenovirusvektor, der die Cre-Rekombinase exprimiert, infiziert. Drei Tage später war das pRb-Protein nicht mehr nachweisbar. Die Proliferation dieser Fibroblasten ist vergleichbar mit der der Wildtypzellen und der Zellen mit der *pRb*-Keimbahninaktivierung. Die Zellen unterscheiden sich darin, dass sie zu proliferieren beginnen, wenn *pRb* in der G₀-Phase konditional ausgeschaltet wurde. Damit haben Sage und Mitautoren ein System präsentiert, mit dem sie sporadisch auftretende Krebserkrankungen infolge pRb-Aktivitätsverlust den natürlichen Umständen besser angepasst nachmodellieren können. Außerdem haben sie gezeigt, wie der pRb-Verlust durch andere Proteine kompensiert wird. Mit der gleichen Kinetik, mit der pRb verschwindet, steigt die Expression des pRb-verwandten Proteins p107 (Sage, et al., 2003) und anderer Zellzyklusregulatoren. Interessanterweise erreicht die Expression dieser Proteine nach einigen Zellkultur-Passagen die Höhe, die sie in keimbahninaktivierten pRb^{-/-}-Fibroblasten haben (Berns, 2003).

1.3.1 Nullmutationen der *E2F*-Gene der Maus

Inzwischen wurden die Gene für E2F-1 bis EMA/E2F-6 und für die Pocketproteine in der Maus inaktiviert. Außerdem wurden Mehrfachmutanten von *E2F*-Genen als auch von *E2F*-Genen in Kombination mit dem *pRb*-Gen erzeugt.

E2F-1

Die Inaktivierung des prominentesten Vertreters der Genfamilie wurde als erstes und von zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig beschrieben (Field, et al., 1996; Yamasaki, et al., 1996). Die Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig, haben aber eine Hodenatrophie entwickelt. Histopathologisch wurden in den E2F-1^{-/-}-Hoden der Mäuse ab einem Alter von zwölf Wochen leere und degenerierte seminifere Tubuli entdeckt. Im Gegensatz dazu kommt es in den selben Tubuli zu einer Überproduktion an Leydig Zellen (Field, et al., 1996; Yamasaki, et al., 1996). Die Atrophie konnte auf eine erniedrigte Anzahl an mitotischen Spermatogonien zurückgeführt werden. Als Ursache für den Zellverlust wird eine verringerte Proliferationsrate von spermatogonialen Typ A-Stammzellen vorgeschlagen (Hoja, et al., 2004).

E2F-1-negative Mäuse (in geringerem Maß auch E2F-1^{+/-} Mäuse) entwickeln im Alter von 8 – 18 Monaten eine Reihe seltener aber aggressiver Tumore mit einem hohen Metastasierungspotenzial: Geschlechtsorgansarkome, Lungentumore, Lymphome und einige andere (Yamasaki, et al., 1996). Diese Beobachtung ist überraschend, da E2F nur sehr selten verändert in humanen Tumorzelllinien gefunden wurde (Muller and Helin, 2000; Yamasaki, 1999). Aus *in vitro*-Experimenten war eher eine onkogene Wirkung von E2F-1 bekannt. Der signifikante Anstieg in der Tumorbildung weist darauf hin, dass E2F-1 eine duale Funktion sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor hat. Die Entstehung der Tumore hat wahrscheinlich ihre Ursache in dem Verlust der pRb/E2F-1-vermittelten Zellwachstumshemmung.

Field und Mitarbeiter haben davon abweichende Veränderungen in ihrer Mauslinie gefunden (Field, et al., 1996). Die Thymi sind deutlich vergrößert, dies spiegelt sich in einer Erhöhung der Thymozytenzahl wider. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Entwicklungsstadien der Thymozyten ergab, dass der Anteil reifer Thymozyten erhöht ist. Als Ursache dafür wurde eine erhöhte Überlebensrate E2F-1-negativer Thymozyten in der Zellkultur festgestellt. Dagegen stirbt der Großteil der Wildtypzellen innerhalb des ersten Tages durch Apoptose. Demnach ist der apoptotische Signalweg in E2F-1^{-/-}-Thymozyten gestört. Die Autoren konnten weiter zeigen, dass E2F-1 auch *in vivo* für eine Regulation der Apoptose unreifer Thymozyten unerlässlich ist. Mittels negativer Selektion werden Thymozyten, die Eigenantigene erkennen, eliminiert. Damit verhindert der Körper eine Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene antigene Komponenten (zentrale Selbsttoleranz). Die negative Selektion erfolgt durch den apoptotischen Zelltod dieser Eigenantigen-erkennenden Thymozyten nach Stimulation des T-Zellrezeptors. In E2F-1-defizienten Mäusen sterben weniger Thymozyten nach Stimulation des T-Zellrezeptor-Signalweges. Diese Ergebnisse bestätigen jene Resultate, dass E2F-1 an der Regulation apoptosespezifischer Gene beteiligt ist (DeGregori, et al., 1997).

E2F-2

Der Funktionsverlust des *E2F-2*-Gens führt zu einem frühzeitigen Tod durch eine systemische Autoimmunerkrankung (Murga, et al., 2001). Diese Erkrankung äußert sich in einer enorm vergrößerten Milz (Splenomegalie), in Infiltrationen von Entzündungszellen in mehreren Organen und in vergrößerten Glomeruli mit verstärkter Basalmembran und entzündlicher Infiltrate (Glomerulonephritis). Außerdem lassen sich Antikörper gegen doppelsträngige DNA im Serum nachweisen. Diese pathologischen Veränderungen in der Maus haben Ähnlichkeit zu der Krankheit des Menschen Systemische Lupus erythematoses.

Die Autoimmunerkrankung wird hervorgerufen durch das Fehlen peripherer Mechanismen der Selbsttoleranz des Immunsystems. E2F-2-defiziente T-Lymphozyten hyperproliferieren als Antwort auf eine T-Zell-rezeptor-vermittelte Stimulation, dadurch kommt es zu einer krankhaften Expansion der *Effektor/Memory*-Population der T-Zellen. Diese Hyperproliferation bedeutet, dass E2F-2 die zelluläre Proliferation negativ beeinflusst. Interessanterweise wirkt E2F-2 in T-Lymphozyten, in deutlichem Kontrast zu E2F-1, als transkriptionaler Repressor und hemmt möglicherweise dadurch die Proliferation.

Des Weiteren befindet sich im peripheren Blut E2F-2-defizienter Mäuse eine verringerte Anzahl von Retikulozyten (Proerythrozyten) (Li, et al., 2003). Diese Reduktion wird wahrscheinlich durch eine geringere Retikulozytenproduktion aus erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark verursacht und nicht durch einen erhöhten Zellumsatz. Die Autoren postulieren, dass die unvollständige B-Zellreifung auf eine gestörte S-Phase des Zellzyklus und eine Verhinderung der Differenzierung aufgrund des Unvermögens der Zellen, den Zellzyklus zu verlassen, zurückzuführen ist. Da außerdem die Erythrozyten vergrößert sind, entsprechen diese

Veränderungen der Erkrankung Megaloblastische Anämie.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede innerhalb des Immunsystems zwischen E2F-1- und E2F-2-negativen Mäusen weisen auf eine funktionale Spezialisierung einzelner E2F-Familienmitglieder hin. Beide E2F spielen wichtige Rollen bei der Entwicklung des Repertoires aktiver T-Zellen, die die Selbsttoleranz des Immunsystems bestimmen: E2F-1 reguliert den programmierten Tod unreifer Thymozyten und die Proliferation reifer T-Zellen positiv. Im Gegensatz dazu unterdrückt E2F-2 die T-Zell-Proliferation.

E2F-1/E2F-2-Doppelnulmutation

Mäuse mit einer Inaktivierung des *E2F-1*- und des *E2F-2*-Gens haben einen Defekt in der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark (Li, et al., 2003; Zhu, et al., 2001). Die Mengen der B-Zellen in den späteren Entwicklungsstadien, das kleine Prä-BII-Zell- und die IgM⁺-Stadien, sind deutlich reduziert. Diesen Effekt zeigen *E2F-2*-mutierte Mäuse abgeschwächt. Andererseits proliferieren verschiedene Typen hämatopoetischer Vorläuferzellen verstärkt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da E2F-1 und E2F-2 eher ein positiver Einfluss auf den Zellzyklus zugeschrieben wird. Da im Knochenmark eine große Heterogenität an hämatopoetischen Zellen existiert, wurden periphere T-Zellen isoliert, um in ihnen die Rollen von E2F-1 und E2F-2 bei der Regulation der Proliferation zu untersuchen (Zhu, et al., 2001). Der Anteil proliferierender E2F-1/E2F-2-negativer T-Lymphozyten als auch die Intensität der Proliferation ist erhöht im Vergleich zu Wildtypzellen. Interessanterweise haben E2F-1^{+/-}/E2F-2^{-/-}-Lymphozyten einen schwächer ausgeprägten Proliferationsanstieg als E2F-1^{-/-}/E2F-2^{-/-}-Lymphozyten, im Gegensatz dazu ist die Proliferation von E2F-1^{-/-}/E2F-2^{+/-}-Lymphozyten reduziert. Daraus kann man ableiten, dass es funktionelle Unterschiede zwischen E2F-1 und E2F-2 gibt. Möglich ist, dass der Verlust von E2F-1 zu einem Verlust einer positiven Regulation des Zellzyklus führt, während die negative Zellzyklusfunktion durch E2F-2 kompensiert werden kann. Sind beide Gene inaktiviert, ist der hemmende Einfluss komplett eliminiert, der dominant über den steigernden Einfluss ist.

Generell befinden sich T-Zellen im Ruhezustand. Sie beginnen sich erst bei Anwesenheit antigener Stimuli, die die T-Zellen über den T-Zellrezeptor aktivieren, sehr intensiv zu teilen. E2F-1/E2F-2-negative T-Lymphozyten beginnen bereits bei sehr niedrigen Stimulationsdosen, die Wildtyp-T-Zellen nicht aktivieren können, zu proliferieren (Zhu, et al., 2001). Signalstärken unterhalb des Schwellenwertes von Signalen oberhalb des Schwellenwertes zu unterscheiden, ist eine enorm wichtige Fähigkeit von T-Zellen. Beispielsweise durchlaufen CD8⁺ T-Lymphozyten eine 10⁵-fache Vervielfältigung innerhalb einer Woche als Antwort auf ein Fremdantigen. Daher hat die Verhinderung einer T-Zellaktivierung infolge einer Stimulationsintensität unterhalb eines Schwellenwertes eine große Bedeutung. Die Identifizierung in diesem Prozess relevanter E2F-1/2-Zielgene wird zu einem besseren Verständnis der Kontrolle der T-Zellaktivierung beitragen.

Li und Mitarbeiter beschreiben eine generelle Störung der Entwicklung vieler zellulärer Komponenten des Blutes, die sich in reduzierten Zellzahlen in den blutbildenden Organen und dem peripheren Blutes widerspiegeln (Li, et al., 2003). Außerdem vermag das Knochenmark mit einer E2F-1/2-Doppelnulmutation das Knochenmark mit einer tödlichen Dosis bestrahlter Wildtypmäuse nur eingeschränkt auf zellulärer Ebene zu ersetzen. Diese hämatopoetischen Defekte korrelieren mit einer stark verlängerten S-Phase des Zellzyklus hämatopoetischer Vorläuferzellen. Als direkte Ursache dafür ziehen die Autoren die verminderte Expression einer Teilgruppe von E2F-Zielgenen wie *ZyklinA2* und *cdc2* heran. Diese Expressionsveränderungen sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass der Zellzyklus und die Differenzierung innerhalb der Blutzellentwicklung nicht mehr koordiniert werden können.

Die zusätzliche Mutation einer Kopie des *E2F-1*- oder des *E2F-2*-Gens in einem Mausstamm, indem des entsprechend andere *E2F*-Gen schon inaktiviert ist, führt mit hoher Wahrscheinlichkeit dazu, dass die Mäuse Tumore entwickeln (Zhu, et al., 2001). Für einen *E2F-1*-Verlust ist eine moderat erhöhte Tumorfrequenz bereits beschrieben worden (Yamasaki, et al., 1996). Zhu und Mitarbeiter konnten diese Beobachtung in einem anderen Mausstammhintergrund bestätigen, obwohl sich hier das Tumorspektrum verschoben hat. Dagegen resultiert eine Mutation von *E2F-2* in einem dramatischen Anstieg der Tumorfrequenz mit einer Häufung von Lymphomen. Mäuse mit einer Doppelnullduplikation sterben bereits nach durchschnittlich 4 Monaten an Diabetes mellitus. In diesem Alter konnte keine spontanen Tumore festgestellt.

Im Alter von acht Wochen haben mehr als 90 Prozent der doppelt defizienten Mäuse Diabetes entwickelt. Die Zuckerkrankheit Diabetes mellitus wird durch unzureichende Insulinsekretion oder mangelhafte Stimulation der Zielzellen durch Insulin verursacht, die zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel führt. Der Diabetes ist in *E2F-1^{-/-}/E2F-2^{-/-}*-Mäusen insulin-abhängig und, da keine lymphozytären Infiltrate in der Bauchspeicheldrüse gefunden wurden, nichtautoimmun. Der exokrine Teil der Bauchspeicheldrüse (der Verdauungsenzyme produziert, die in den Zwölffingerdarm sekretiert werden) ist in diesen Mäusen stark geschrumpft. Die verbliebenen exokrinen Zellen werden mit steigendem Alter zunehmend polyploid. In schwerkranken Mäusen findet man daher einen erweiterten Darm mit großen Mengen an unverdaulichem Material. Solche Zellen, die mehrere S-Phasen ohne dazwischenliegende Mitosen durchlaufen haben, gibt es außerdem in der Leber und in der Speicheldrüse (Li, et al., 2003). Die Degeneration der exokrinen Zellen schafft wahrscheinlich eine Umgebung, die mit der Zeit zum Sterben der endokrinen B-Zellen (die das blutzuckersenkende Hormon Insulin bereitstellen) in den Langerhans-Inseln führt. Der Transfer von Knochenmark aus Wildtyp-Mäusen in mit einer tödlichen Dosis bestrahlte *E2F-1^{-/-}/E2F-2^{-/-}*-Mäuse hat ein überraschendes Ergebnis erbracht: Bereits bestehender Diabetes wird reduziert bzw. im Entstehen begriffener Diabetes wird verhindert. Gleichzeitig wird die Anzahl der B-Zellen erhöht (Li, et al., 2003). Da aber die neugebildeten B-Zellen ausschließlich vom Empfänger abstammen, spielen offenbar Zellen oder von diesen sekretierte Faktoren des sich regenerierten Knochenmarks eine fördernde Rolle für das Überleben der Inselzellen. Das bedeutet, dass die Störung des hämatopoetischen Systems durch die Inaktivierung von *E2F-1* und *E2F-2*, zum Verlust der B-Zellen und folglich zur Ausprägung von Diabetes beiträgt (Li, et al., 2003).

E2F-3

Die Keimbahninaktivierung des *E2F-3*-Gens der Maus führt zum Expressionsverlust beider *E2F-3*-Isoformen und verursacht den dramatischsten Phänotyp eines inaktivierten *E2F* (Humbert, et al., 2000). Nur ein Viertel der nach der Mendelschen Spaltungsregel erwarteten *E2F-3^{-/-}*-Mäuse werden lebensfähig geboren. Humbert und Mitautoren haben sich auf die Charakterisierung von MEF konzentriert. Der Verlust von *E2F-3* verzögert den Beginn der DNA-Synthese nach Serumstimulation von in der G0-Phase befindlichen Zellen, und zusätzlich ist die Rate der DNA-Synthese entscheidend verringert. Die Folge ist eine verminderte Proliferation. *E2F-3* wird in die Untergruppe der aktivierenden *E2F* eingeordnet. In *E2F-3*-negativen MEF ist die Zellzyklus-abhängige Induktion vieler bekannter *E2F*-Zielgene, die selbst wichtige Funktionen innerhalb des Zellzyklus haben, dereguliert. Darunter sind die *Zykline E* und *A2*, *cdc2* und *PCNA*. Ihre Transkriptmengen sind enorm verringert und der Zeitpunkt des Expressionsmaximums nach Serumstimulation ist verzögert (Humbert, et al., 2000).

Interessanterweise entwickeln *E2F-3*-negative Mäuse in Gegensatz zu *E2F-1*- und *E2F-2*-negativen Mäusen keine Tumore. Die Tumorsuppressorfunktion ist somit eine spezifische Eigenschaft von *E2F-1* und *E2F-2*. *E2F-*

3^{-/-}-Mäuse sterben an kongestiven (infolge steigenden Füllungsdruck) Herzversagen (Cloud, et al., 2002). Große Thrombi befinden sich in den linken Atrien von gestorbenen Mäusen und Embryonen, in einigen Fällen füllen sie fast das gesamte Atrium aus und reichen bis in den linken Ventrikel. Diese Fibrinthrombi bilden sich ausschließlich im Herzen, was weist auf einen primären Herzfehler hinweist. Die mechanistische Basis des Phänomens ist unbekannt.

E2F-1/E2F-3-Doppelnulmutation

Die Analyse von E2F-1^{-/-}/E2F-3^{-/-}-Mäusen zeigte, dass beide Faktoren mindestens eine biologische Eigenschaft gemeinsam haben, da die Defekte infolge der Mutation jeweils eines *E2F* durch die parallele Inaktivierung des anderen Familienmitgliedes verstärkt werden (Cloud, et al., 2002). E2F-3-negative Mäuse, die hetero- oder homozygot in der *E2F-1*-Mutation sind, sind in einem gemischten C57BL/6x129Sv-Stammhintergrund nicht lebensfähig. In diesem Hintergrund werden E2F-3-defiziente Mäuse mit reduzierter Häufigkeit geboren (Humbert, et al., 2000). Die Mäuse mit Mutationen in beiden Genen sterben spätestens nach 9,5 Entwicklungstagen im Uterus (Cloud, et al., 2002; Wu, et al., 2001). Die Wachstumsverzögerung, die bei E2F-3^{+/-}- und E2F-3^{-/-}-Embryonen beobachtet wurde, wird durch die E2F-1-Mutation verstärkt (Cloud, et al., 2002). Im Übereinstimmung damit werden auch die Defekte von E2F-1-defizienten Mäusen, verkleinerte Hoden und Reduktion der Spermienanzahl (Yamasaki, et al., 1996), durch ein defektes *E2F-3*-Allel verstärkt. Interessant ist, dass die Lebenserwartung von E2F-1-negativen Mäusen, die infolge der Tumorentwicklung erniedrigt ist, durch eine zusätzliche *E2F-3*-Mutation nicht verkürzt wird. Dies spiegelt sich auch in einer unveränderten Wahrscheinlichkeit, Tumore zu entwickeln, und dem unveränderten Tumorspektrum wider. Das Herzversagen, das Ursache für den frühen Tod von E2F-3-negativen Mäusen ist, setzt durch zusätzliche Inaktivierung von mindestens einem *E2F-1*-Allel früher ein (Cloud, et al., 2002).

Auch die Proliferationsverzögerung von MEF ist stärker ausgeprägt als infolge des alleinigen E2F-3-Verlustes (Wu, et al., 2001).

E2F-2/E2F-3-Doppelnulmutation

Die Untersuchungen zur funktionellen Redundanz zweier aktivierender E2F wurde komplettiert mit der Generierung von E2F-2^{-/-}/E2F-3^{-/-}-Mäusen (Wu, et al., 2001). Im Gegensatz zu lebensfähigen E2F-1/E2F-2-defizienten Mäusen sterben E2F-2/E2F-3-defiziente Mäuse früh während ihrer Embryonalentwicklung (spätestens nach 9,5 Entwicklungstagen). Da E2F-1/E2F-3-defiziente Embryonen ebenfalls in diesem Stadium versterben, spielt offenbar E2F-3 die zentrale Rolle für eine normale Entwicklung.

In E2F-2^{-/-}/E2F-3^{-/-}-MEF ist die Reduktion der Proliferationsrate stärker als durch den Verlust von E2F-1 und E2F-3 (Wu, et al., 2001).

E2F-1/E2F-2/E2F-3-Dreifach-Nullmutation

In MEF führt die Nullmutation des *E2F-3*-Gens zur Reduktion der Zellproliferation (Humbert, et al., 2000). Zusätzliche Inaktivierung des *E2F-1*-Gens verstärkt die Reduktion; die Inaktivierung von *E2F-2* anstatt von *E2F-1* verstärkt den Proliferationsdefekt weiter. Fehlt die Untergruppe der aktivierende E2F komplett, wachsen die Fibroblasten nicht mehr (Wu, et al., 2001). Daraus kann man ableiten, dass E2F-1 und E2F-2 mit E2F-3 kooperieren, um die Proliferation zu steuern. Wahrscheinlich führt dieser schwere Wachstumsdefekt zur frühen embryonalen Letalität E2F-1/E2F-3- und E2F-2/E2F-3-defizienter Mäuse.

Die Analyse des Wachstumsdefekts zeigte einen verzögerten Eintritt in die S-Phase (Wu, et al., 2001). Die Stärke der Hemmung korreliert mit der Schwere des Defekts in Abhängigkeit davon, welches E2F fehlt. Die Zellen sind unempfindlich gegen Serumentzug, der normalerweise Primärzellen in der G₀-Phase akkumulieren lässt. Wie zu erwarten war, ist die Transkriptionsaktivierung von E2F-Zielgenen stark reduziert. Es gibt aber auch E2F-Zielgene wie *Zyklusin E*, deren Transkription dereprimiert sind. Bei diesen Genen wird aus der Pocket-protein-vermittelte Repression möglicherweise nach E2F-Verlust eine Derepression. Interessanterweise bleibt die Transkription anderer bekannter E2F-regulierter Gene unverändert. Es ist den Autoren gelungen, eine durch E2F beeinflusste Schlüsselaktivität der Zellzyklussteuerung zu identifizieren: den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1}. In den dreifach mutierten Fibroblasten ist die p21^{Cip1}-Expression deutlich erhöht. Dies korreliert mit verringerten CDK2- und Zyklusin B-assoziierten Kinaseaktivitäten, die wiederum (zumindest CDK2) für die nachgewiesene Unterphosphorylierung von pRb zuständig sein können. Es ist allgemein akzeptiert, dass unterphosphoryliertes pRb eine potente Hemmaktivität des Zellwachstums hat. Denkbar ist, dass pRb in diesem Fall die Transkriptionsrepression mittels E2F-4 und -5 bewirkt. Die Hemmung könnte verstärkt werden durch p130/E2F-4/5-Komplexe. Diese Komplexe sind in Wildtyp-MEF speziell in der G₀-Phase an E2F-Zielpromotoren gebunden (Takahashi, et al., 2000). In den dreifach mutierten MEF können diese Komplexe dagegen auch nach Serumstimulation mit der DNA assoziiert nachgewiesen werden.

E2F-4

E2F-4-negative Mäuse werden blass und gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern zurückgeblieben geboren (Humbert, et al., 2000; Rempel, et al., 2000). Die meisten von ihnen erkranken an einer bakteriellen Infektion der oberen Atemwege, die Mangelernährung und Dehydrierung zur Folge hat. Daran sterben sie drei bis vier Tage nach Geburt. Die erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen der E2F-4^{-/-}-Mäuse wird durch eine Fehlbildung des Gesichtsschädels hervorgerufen (Humbert, et al., 2000). Der Beweis der Todesursache wurde elegant geführt, indem die Mütter mit Antibiotika behandelt oder in eine spezifisch pathogenfreie Umgebung gebracht wurden. Infolge erhöhte sich die Lebensspanne. Der Wachstumsunterschied wurde allerdings nicht vollständig ausgeglichen.

Neben der entwicklungsbiologischen Funktion spielt E2F-4 eine wichtige Rolle bei der Ausreifung (terminalen Differenzierung) des späten Erythrozytenstadiums (Humbert, et al., 2000; Rempel, et al., 2000): Die E2F-4^{-/-}-Embryonen haben eine schwere makrozytäre Anämie, die die Blässe der Neugeborenen bewirkt. Es gibt eine strenge Korrelation der Wachstumsverzögerung der Embryonen mit dem Beginn der Anämie. Die Anämie geht einher mit mehreren Abnormalitäten der Erythrozyten. Obwohl adulte E2F-4^{-/-}-Mäuse ebenfalls die Erythrozytenabnormalitäten zeigen, sind sie nicht oder nur schwach anämisch. Diese Eigenschaft wurde schon bei anderen Mausstämmen mit einer Genmutation beobachtet, und man interpretiert sie damit, dass eine Reservekapazität der Erythrozyten im Embryo noch unterentwickelt ist (Moritz, et al., 1997; Palis and Segel, 1998). Durch die Analyse der Knochenmark-Bestandteile und des Thymus E2F-4-negativer Mäuse wurden weitere entwicklungsspezifische Defekte in verschiedenen hämatopoetischen Linien festgestellt (Rempel, et al., 2000). Zusammengefasst ist der Anteil ausdifferenzierter Zellen der myeloiden und der B-Zell-Linie reduziert, dagegen sind unreife Zellen vermehrt zu finden. Zusätzlich weist sowohl die Gesamtzellpopulation des Knochenmarks als auch der Anteil myeloider Zellen eine doppelt so hohe Apoptoserate auf als in Wildtyp-Mäusen.

E2F-4 wird auch in der proliferativen Zone des embryologischen Darmes und in adulten Mäusen im Dünn- und Dickdarm exprimiert. In E2F-4-defizienten Mäusen ist diese Zone (die Kryptenregion) stark abgeschwächt

oder fehlt komplett, die Mikrovilli sind verkümmert, die Lamina propria (die Basis der Mikrovilli) ist ebenfalls dünner als in Wildtyp-Mäusen, und die zentralen Blutgefäße der Mikrovilli sind weniger stark ausgeprägt. Eine weitere Veränderung im Dünndarm weist auf eine essentielle Rolle von E2F-4 entweder bei der Bildung oder bei der Erhaltung des Darmepithels hin: Viele Enterozyten sind von vakuolisierten Zellen ersetzt oder verdrängt worden (Rempel, et al., 2000).

Bemerkenswert ist, dass die Expression der untersuchten E2F-Zielgene in E2F-4-negativen MEF unverändert ist, obwohl die Aktivität von E2F-4 in DNA-Bindungsstudien nicht von anderen Familienmitgliedern ausgeglichen wird. Die unveränderte Expression der für den Zellzyklus relevanten Zielgene steht in Einklang mit einer normalen Zellproliferation mehrerer primärer Zelllinien nach E2F-4-Verlust (Humbert, et al., 2000; Rempel, et al., 2000).

E2F-5

E2F-5 hat eine wichtige Rolle für die Lebensfähigkeit von Mäusen (Lindeman, et al., 1998). Mäuse mit inaktiviertem *E2F-5*-Gen entwickeln einen sogenannten Wasserkopf (Hydrozephalus) durch eine Überproduktion von zerebrospinaler Flüssigkeit des Epithels des Plexus choroidei und sterben im Alter von wenigen Wochen an deren Folgen: Durch schwere intrazerebrale und intraventrikuläre Blutungen werden viele der zerebralen Kortizes zerstört. So verändert der E2F-5-Verlust die sekretorischen Eigenschaften eines differenzierten neuralen Gewebes, hat aber keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

E2F-4/E2F-5-Doppelnulldmutation

Die enge Verwandtschaft von E2F-4 und E2F-5 äußert sich in der funktionellen Redundanz bei paralleler Inaktivierung beider Gene (Gaubatz, et al., 2000). Es ist wenigstens ein Wildtyp-Allel von *E2F-4* oder *E2F-5* für die Lebensfähigkeit der Mäuse notwendig. Allerdings wirkt das Fehlen von E2F-4 schwerwiegender. Die Defekte der E2F-4/E2F-5-mutierten Mäuse sind nicht analysiert worden. Im Gegensatz dazu ist das Wachstumsverhalten von E2F-4^{-/-}/E2F-5^{-/-}-MEF eingehend untersucht worden (Gaubatz, et al., 2000). p16^{INK4a} ist ein Inhibitor G1-Zyklus-abhängiger Kinasen. p16^{INK4a}-Synthese führt zur Akkumulierung von gering phosphoryliertem pRb, dass dadurch an E2F gebunden bleibt und die Transkription von für die G1-Progression wichtiger Gene hemmt. Die Auswirkung einer p16^{INK4a}-Aktivierung ist letztendlich ein effektiver Zellzyklusarrest in der G1-Phase. In E2F-4^{-/-}/E2F-5^{-/-}-MEF hat exogenes p16^{INK4a} keinen Einfluss mehr auf die Zellzykluskinetik. Obwohl die Autoren nicht gezeigt haben, ob noch andere *E2F*-Gene in den p16^{INK4a}-vermittelten Zellzyklusarrest involviert sind, weisen die Daten darauf hin, dass der p16^{INK4a}-Arrest durch die E2F-4/E2F-5-vermittelte Transkriptionsrepression erzeugt wird.

EMA/E2F-6

Während der Anfertigung der vorliegenden Dissertation ist bereits eine Charakterisierung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse veröffentlicht worden (Storre, et al., 2002). Die Mäuse sind lebensfähig und entwickeln sich weitgehend normal. Im Hoden sind die Leydig-Zellen (Hodenzwischenzellen) vermehrt, die Menge reifer Spermien ist dagegen reduziert. Der Nebenhoden (Duktus epididymis) ist ebenfalls nur gering mit Spermien gefüllt. Diese testikulären Veränderung sind jedoch ohne Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Mäuse. Interessant ist, dass ebenfalls in *E2F-1*-mutierten Mäusen ein Anstieg der Menge an Leydig-Zellen und ein unvollständiger Füllungszustand des Nebenhodens ohne Fruchtbarkeitsverlust beobachtet werden konnte (Field, et al., 1996;

Yamasaki, et al., 1996). Möglicherweise ist eine Überproduktion der Leydig-Zellen die Ursache für die verringerte Spermienbildung.

Außerdem haben EMA/E2F-6-defiziente Mäuse posteriore Transformationen der Wirbelsäule: (1) der kaudal letzte rippentragende Wirbel (T13) ist zum ersten Lendenwirbel (L1) transformiert; (2) der kaudal letzte Lendenwirbel (L6) wurde zum ersten Schwanzwirbel (S1). Dieser Phänotyp ist in Zusammenhang zu bringen mit dem Vorkommen von EMA/E2F-6 und verschiedenen Pc-G-Proteinen in einem Komplex (Ogawa, et al., 2002; Trimarchi, et al., 2001). So verursacht die Inaktivierung der Mausgene beispielsweise für die Pc-G-Proteine Bmi-1 oder Mel-18 ebenfalls diese Transformationen (Akasaka, et al., 1996; van der Lugt, et al., 1994). Das Ausmaß der Bmi-1^{-/-}- und Mel-18^{-/-}-spezifischen Wirbelveränderungen ist allerdings dramatischer als in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen. Außerdem haben diese Pc-G-Protein-defizienten Mäuse zusätzlich schwere Defekte, die zum frühen Tod führen, aber bei EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen nicht beobachtet werden konnten. Die Minderung der Defekte in EMA/E2F-6-negativen Mäusen deutet an, dass zwar EMA/E2F-6 in dem Komplex eine essentielle Funktion hat, aber der Verlust von Pc-G-Proteinen dessen Aktivität stärker beeinflusst.

Tabelle 1: **Zusammenfassung der Phänotypen von E2F-Mausmutanten** [verändert nach (DeGregori, 2002)]

| Inaktivierte Gene | Auswirkungen auf die Maus | Auswirkungen auf Primärzellen |
|--------------------|--|--|
| <i>E2F-1</i> | Hodenatrophie reduzierte T-Zell-Apoptose erhöhte Tumorrare | reduzierte T-Zell-Proliferation reduzierte Apoptose der Thymozyten verzögerte Myc-induzierte Apoptose in MEF |
| <i>E2F-2</i> | Autoimmunität erhöhte Tumorrare gesteigerte Proliferation hämatopoetischer Zellen | gesteigerte T-Zell-Proliferation reduzierter Myc-induzierter S-Phase-Eintritt in MEF |
| <i>E2F-1/-2</i> | insulinabhängiger Diabetes gesteigerte Proliferation hämatopoetischer Zellen fehlende Spermatogenese | gesteigerte T-Zell-Proliferation |
| <i>E2F-3</i> | teilweise embryonale Letalität infolge Herzversagens | reduzierter S-Phase-Eintritt in MEF |
| <i>E2F-1/-2/-3</i> | frühe embryonale Letalität | fehlender S-Phase-Eintritt in MEF |
| <i>E2F-4</i> | embryonale Letalität infolge Deformation des Gesichtsschädels Defekte in der Hämatopoese und im Darm | — |
| <i>E2F-5</i> | pränatale Letalität infolge Differenzierungsdefekt einer endokrinen Drüse | — |
| <i>E2F-4/-5</i> | embryonale Letalität | fehlender p16-induzierter Zellzyklusarrest in MEF |
| EMA/E2F-6 | reduzierte Spermatogenese milde Transformation des Axenskeletts | — |
| DP-1 | frühe embryonale Letalität infolge Fehlentwicklung des extraembryonalen Gewebes (Kohn, et al., 2003) | — |

Obwohl EMA/E2F-6 die Expression wichtiger Faktoren des DNA-Stoffwechsels und des Zellzyklus reguliert, haben EMA/E2F-6-defiziente MEF keinen Defekt (Storre, et al., 2002). Wird in diesen Zellen zusätzlich die E2F-4-Expression mittels siRNA unterbunden, ändert sich das Zellzyklusprofil immer noch nicht, aber die

Expression der EMA/E2F-6-Zielgene ist dereprimiert (Giangrande, et al., 2004). In dieser Arbeit ist das erste Mal für die E2F-Familie gezeigt worden, wie genetische Redundanz auf molekularer Ebene funktioniert. E2F-4 ist in der S-Phase an die Zielgene gebunden, die in Wildtyp-Zellen in dieser Zellzyklus-Phase von EMA/E2F-6 gebunden werden. Dafür ändert sich die zelluläre Lokalisation von E2F-4 vom Zellplasma in den Kern. E2F-4 übernimmt bei EMA/E2F-6-Verlust die Repression der Genexpression. Erst wenn beide repressorischen Aktivitäten fehlen, ist die Transkription bestimmter Gene dereguliert.

E2F-mutierte Mauslinien sind durch ein Spektrum individueller Defekte (zusammengefasst in Tabelle 1) gekennzeichnet und liefern einen klaren Beleg für die biologische Spezifität jedes E2F. Mutationen mehrerer Gene verdeutlichen funktionelle Redundanzen untereinander. Bisher sind Mehrfachmutationen innerhalb einer Untergruppe generiert worden. Mutanten, die E2F aus verschiedenen Untergruppen beinhalten, werden zeigen, ob auch zwischen den Untergruppen funktionelle Kompensation stattfindet.

1.3.2 Kombinierte Nullmutationen von *E2F* und *pRb*

Die Promotoraktivität von E2F-Zielgenen wird zellzyklusphasenabhängig durch die Assoziation der Pocketproteine mit E2F-1 bis -5 reguliert. pRb bildet Protein-DNA-Komplexe mit E2F-1, -2, -3 und -4 (Helin, et al., 1992; Ikeda, et al., 1996; Ivey-Hoyle, et al., 1993; Kaelin, et al., 1992; Lees, et al., 1993; Moberg, et al., 1996; Shan, et al., 1992). Mäuse mit inaktivierten *pRb*-Gen sterben während der Embryonalentwicklung zwischen den Entwicklungstagen E13,5 und E14,5 wahrscheinlich infolge einer unvollständigen Erythrozyten-Differenzierung in der fötalen Leber, die zur Apoptose der Erythrozyten und Hepatozyten führt (Clarke, et al., 1992; Jacks, et al., 1992; Lee, et al., 1992). Außerdem haben die Embryonen eine beeinträchtigte Neurogenese. Zentrales und peripheres Nervensystem sowie die Augenlinsen zeigen sowohl einen veränderten Eintritt in die S-Phase als auch eine erhöhte Apoptoserate. Beachtenswert ist, dass die Apoptose im Zentralnervensystem, in den Linsen und in der Leber p53-abhängig dagegen im peripheren Nervensystem p53-unabhängig ist (Macleod, et al., 1996; Morgenbesser, et al., 1994).

pRb^{+/-}-Mäuse entwickeln Hypophysenmittellappen-Tumore und sterben daran im Alter von neun bis zehn Monaten (Hu, et al., 1994; Williams, et al., 1994). Zusätzlich entwickelt eine signifikante Anzahl medulläre Schilddrüsenkarzinome. Diese Tumorbildungen bestätigen pRb als klassischen Tumorsuppressor auch in der Maus. Die Analyse von Mäusen mit kombinierten Mutationen sowohl in *pRb* als auch *E2F* vervollständigte unser Wissen über die Funktionen der einzelnen E2F besonders im Hinblick auf den Einfluss von E2F auf die tumorsuppressorische Wirkung von pRb.

E2F-1-, E2F-3- und E2F-4-Defizienz erhöht jeweils die Lebenserwartung von Mäusen mit heterozygot bzw. homozygot inaktivierten *pRb* (Lee, et al., 2002; Tsai, et al., 1998; Ziebold, et al., 2001). Sowohl pRb^{-/-}/E2F-1^{-/-}- als auch pRb^{-/-}/E2F-3^{-/-}-Mäuse sterben erst am Ende ihrer Embryonalentwicklung mit einer Anämie und Defekten in der Entwicklung der Skelettmuskulatur und der Lungen. Die unvollständige Kompensation der pRb-abhängigen Defekte bedeutet, dass die Regulation E2F-1- und E2F-3-abhängiger Zielgene nicht die einzige Funktion von pRb während der Embryogenese ist, sondern dass im späteren Embryonalstadium weitere pRb-Zielfaktoren existieren. Die verlängerte Lebensdauer der pRb^{-/-}/E2F-1^{-/-}- und pRb^{-/-}/E2F-3^{-/-}-Embryonen beruht auf der Milderung der Phänotypen der pRb-negativen Embryonen (Tsai, et al., 1998; Ziebold, et al., 2001): (1) das Fehlen der Apoptose im zentralen Nervensystem und in den Augenlinsen, (2) die deutliche

Reduktion des veränderten S-Phase-Eintritts in diesen Geweben, (3) die teilweise Hemmung der Apoptose im peripheren Nervensystem und (4) eine leichte Erhöhung der Zahl zellkernfreier (ausdifferenzierter) Erythrozyten. Obwohl es eine klare Überschneidung der Funktionen von E2F-1 und E2F-3 in der Entwicklung und Erhaltung vieler Gewebe gibt (Dies ist ebenfalls evident in E2F-1/E2F-3-doppeltnegativen Mäusen (Cloud, et al., 2002).), ist zu betonen, dass der E2F-3-Verlust eine vollständigere Kompensation der pRb^{-/-}-Phänotypen zur Folge hat. Sowohl der erhöhte S-Phase-Eintritt als auch die p53-abhängige Apoptose verschwinden durch homozygote *E2F-3*-Inaktivierung vollständig; so ist auch die Hemmung der Apoptose selbst in pRb^{-/-}/E2F-3^{+/-}-Mäusen stärker als in pRb^{-/-}/E2F-1^{-/-}-Mäusen.

Andererseits wird auch die Überlebensrate E2F-3-negativer Mäuse erhöht. In einem gemischten genetischen Stammhintergrund gibt es nur sehr wenige E2F-3-negativer Mäuse, die überleben (Humbert, et al., 2000). Ein mutiertes *pRb*-Allel vergrößert diese Gruppe um das Dreifache (Ziebold, et al., 2003).

Neben dem Einfluss von E2F-3 auf die Genese *pRb*-mutierter Embryonen haben Ziebold und Mitarbeiter das Tumorspektrum von pRb^{+/-}/E2F-3^{-/-}-Mäusen analysiert (Ziebold, et al., 2003). In diesem Mausgenotyp kommt eine duale Funktionsweise von E2F-3 zum Vorschein. Die Schilddrüsentumore sind deutlich kleiner als in pRb^{+/-}-Mäusen. Die Reduktion des Tumorwachstums erhöht die Lebenserwartung der pRb^{+/-}/E2F-3^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu pRb^{+/-}-Mäusen. Bereits die heterozygote E2F-3-Inaktivierung bewirkt eine signifikante Lebensverlängerung; E2F-3 wirkt also in diesem Kontext konzentrationsabhängig und als Onkogen. Dazu gegensätzlich wird in pRb^{+/-}-Mäusen die Aggressivität der Hypophysenmittellappen-Tumore und deren Metastasierungsverhalten nach *E2F-3*-Inaktivierung dramatisch gesteigert. In diesem Fall hat E2F-3 demnach eine tumorsuppressorische Wirkung.

Neben der Inaktivierung von *E2F-3* verlängert auch die *E2F-4*-Inaktivierung das Leben der pRb^{+/-}-Mäuse (Lee, et al., 2002). Die Mehrheit stirbt an Defekten infolge der *E2F-4*-Nullmutation. Andererseits hemmt der E2F-4-Verlust die Entwicklung sowohl von Schilddrüsen- als auch von Hypophysentumoren der pRb^{+/-}-Mäuse. Dieses Ergebnis war unerwartet, da E2F-4-haltige Komplexe in Zellkulturanalysen als transkriptionaler Repressor identifiziert wurden. Diese Tumorchemmung erfolgt offenbar durch die Bildung neuer Komplexe. In Kontroll- und pRb^{+/-}-Gewebe ist pRb mit E2F-1 und E2F-3 assoziiert. Die Abwesenheit von E2F-4 ermöglicht den im Normalfall E2F-4-assoziierten Pocketproteinen p107 und p130 die aktivierenden E2F-1 und E2F-3 zu binden und wahrscheinlich deren Aktivität zu reprimieren. Die neuen Komplexe hemmen wahrscheinlich die Expression der für die DNA-Synthese kritischen Zielgene wie *Zyklin E* und damit die Zellproliferation in pRb^{-/-}/E2F-4^{-/-}-Zellen (Lee, et al., 2002).

1.4 Ziel der Arbeit

EMA/E2F-6 wurde sowohl mittels eines Hefeinteraktions-Systems (Morkel, et al., 1997) als auch durch Homologievergleiche in *Online*-Datenbanken (Cartwright, et al., 1998; Gaubatz, et al., 1998; Trimarchi, et al., 1998) identifiziert. Beide Zugänge lieferten allerdings keine Information über die Funktion des neu entdeckten Faktors. EMA/E2F-6 wurde durch einen Vergleich der Aminosäure-Primärsequenz mit den anderen E2F und in *in vitro*-Experimenten biochemisch charakterisiert. Für ein Verständnis physiologischer Vorgänge in der Zelle und letztlich in einem Gesamtorganismus ist es notwendig, die Funktionen eines Faktors unter möglichst wenig manipulierten Bedingungen zu kennen. Um diese biologische Funktionen bestimmen zu können, bestand die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit in der Generierung und Analyse von EMA/E2F-6-defizienten Mäusen.

Dafür mußte das *EMA/E2F-6*-Gen in embryonalen Stammzellen funktionell inaktiviert werden. In Zellen, Geweben oder Organen der Mäuse, in denen *EMA/E2F-6* eine limitierende Funktion ausübt, entstehen infolge der Abwesenheit von *EMA/E2F-6* Veränderungen oder gar Defekte, die Rückschlüsse auf dessen Funktion zulassen. Eine wichtige Frage war, ob *EMA/E2F-6* wie andere E2F an der Kontrolle der Proliferation beteiligt ist und bei der Entwicklung von Tumoren eine Rolle spielt. Da *EMA/E2F-6* ein Transkriptionsfaktor ist, war die Identifizierung physiologischer Zielgene für ein Verständnis der Funktion von großer Bedeutung.

2 Methoden und Materialien

2.1 Zellkultur

2.1.1 Präparation, Kultur und transiente Transfektion primärer embryonaler Mausfibroblasten

MEF wurden nach den Protokollen von (Robertson, 1987) und (Hertzog, 2001) präpariert. Dafür wurden EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse (bzw. transgene Neomycin-resistente Wildtypmäuse für ES-Zellen [*feeder layer*]) verpaart und die Weibchen allmorgendlich auf einen Vaginalpfropf als Zeichen einer erfolgten Kopulation untersucht. Beim Auffinden eines Pfropfes wurde das Gewicht der Weibchen bestimmt (0,5 p. c.). 13 Tage später (13,5 p. c.) wurden die Weibchen erneut gewogen und falls sie mindestens 3 g zugenommen hatten, wurde davon ausgegangen, dass die Kopulation zu einer Empfängnis geführt hatte. Um die Embryonen gewinnen zu können, wurden die Weibchen durch Zervixdislokation getötet. Die Embryonen wurden steril entnommen und von der Plazenta und den Eihüllen befreit. Der Kopf wurde abgetrennt (und für die Genotypisierung verwendet), die inneren Organe entfernt und der übrige Körper mehrfach in PBS (*phosphat buffered saline*, 8,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde der Körper in einer 60 mm-Schale mit einer Rasierklinge maximal zerkleinert, mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,25% w/v Trypsin, 0,04% w/v EDTA, Invitrogen) bedeckt und bei 37°C inkubiert. Nach 10 min wurde das Gewebe 15-mal mit einer lang ausgezogenen Pasteurpipette auf und ab pipettiert, für weitere 10 min inkubiert und nochmals 15-mal auf und ab pipettiert. Die Behandlung wurde durch Zugabe von 5 ml FBS (fötales Kälberserum) gestoppt. Die Suspension wurde in eine 100 mm-Schale überführt, 3 ml Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium mit Glutamax [DMEM, Invitrogen], 10 % FBS [Biochrom, Berlin], 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) zugegeben und in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. 24 h später wurde das Medium gewechselt. Falls die Schale nach zwei (bis drei) Tagen konfluent gewesen ist, wurden die Fibroblasten weiter verwendet. Die Fibroblasten wurden jetzt als Passage null definiert.

Die Zellen wurden aller drei Tage passagiert und in einer Dichte von 2,5x10⁶ Zellen pro 148 mm-Schale erneut ausgesät. MEF wurden vor allem zwischen Passage zwei und vier in Experimenten eingesetzt und maximal bis Passage fünf kultiviert.

800 µl Zellen in einer Dichte von 5x10⁶ Zellen/ml wurden in Medium in einer 4 mm-Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette, 4 mm, Bio-Rad) mit 20 µg gereinigter Plasmid-DNA (über eine Anion-Austausch-Säule, Quiagen) mittels eines Einzelpulses bei 280 V und 1500 µF (Elektroporator: Easysject+, Equibio, Großbritannien) transfiziert. 2 µg RSV-β-Gal wurden als interne Kontrolle kotransfiziert, um die Transfektionsraten zwischen den Transfektionsansätzen abgleichen zu können. Ein Ansatz wurde mit 3 µg pDS-Red2-N1 parallel transfiziert, um die Transfektionseffizienz generell abschätzen zu können. Gegebenenfalls wurde die DNA-Menge mit pUC19 aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen auf eine 100 mm-Schale gebracht. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

2.1.2 Präparation und Kultur immunokompetenter Mauszellen

Zuerst wurde eine gemeinsame Zellsuspension aus der Milz, dem Thymus und den Lymphknoten, die aus Mäusen des 129Ola-Stammes präpariert worden waren, hergestellt, indem die Gewebe durch ein 70 µm-Nylon-

sieb (Cell Strainer, Becton Dickinson Falcon) gequetscht wurden. Für die Präparation von T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wurde die Zellsuspension aufgeteilt. Zur Separation von CD4⁺-Zellen daraus wurde ein Teil der Suspension mit einem Fluoreszin-Isothiocyanat-konjugiertem (FITC) CD4- Antikörper (DRFZ) für 10 min auf Eis in 0,5% w/v BSA in PBS gefärbt. Zur magnetischen Markierung der CD4-positiven Zellen wurden diese für 10 min bei 10°C mit anti-Biotin-*Beads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die magnetisch markierten Zellen über das AutomacsTM-System (Miltenyi Biotec) mit einer Reinheit von $\geq 90\%$ isoliert. Aus dem anderen Teil der Zellsuspension wurden die zu Stimulationszwecken benötigten APC über die Markierung mit MHCII-*Beads* (10 min, 10°C) und Automacs isoliert. Alle Sortierungen wurden mit dem Automacs-Programm „positive selection II“ (posseld2) vorgenommen.

Die Lymphozyten und APC wurden in 10% FBS RPMI 1640-Medium kultiviert.

2.1.3 Kultur, stabile Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Die ES-Zellen wurden bei 37°C schnell aufgetaut, in ES-Zell-Medium (15% FBS [Biochrom, Berlin], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x nicht essentielle Aminosäuren [Invitrogen], 5 mM β -Mercaptoethanol [Invitrogen], Leukemia inhibitory factor [LIF, in Form von konditioniertem Medium von LIF-exprimierenden COS-Zellen] in DMEM mit Glutamax [Invitrogen]) aufgenommen und sorgfältig vereinzelt. Sie wurden dann ihrer Anzahl entsprechend auf einer Neomycin-resistenten Wildtyp-MEF-Kultur (*feeder layer*) in 35 oder 60 mm-Schalen kultiviert. Die MEF mußten für diese Zwecke vorher wachstumsinhibiert werden. Dazu wurde zu 10 ml Medium in einer 148 mm-Schale 100 µl 1 mg/ml Mitomycin C-Lösung (in PBS und 5% DMSO, Sigma) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Kulturschalen transferiert. Die so inaktivierten Fibroblasten konnten etwa zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden. Wenn die ES-Zellen eine geeignete Dichte erreicht hatten, d. h. viele einzelne Zellklone ohne jedoch konfluent zu sein, wurden sie auf 100 mm-Schalen umgesetzt. Der Mediumswechsel erfolgte täglich.

Für eine Transfektion wurden 1×10^7 Zellen in 800 µl PBS aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette überführt, 20 - 25 µg konzentrierter und linearisierter *Targeting*-Vektor hinzugegeben und bei 300 V und 1200 µF mit einem 2 ms-Impuls elektroporiert (Elektroporator: L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluß wurden die Zellen sofort in Medium resuspendiert und auf vier mit einer dichten MEF-Kultur bewachsenen 100 mm-Schalen ausgesät.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone in 400 µg/ml Geneticin (G418) enthaltendem ES-Zell-Medium gestartet. Die resistenten Klone konnten sieben bis acht Tage nach der Transfektion isoliert werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, erneut mit PBS versetzt und dann die Klone mit einer Pipette in ca. 25 µl PBS abgesaugt und in eine 96-Well-Kulturplatte überführt. Dort wurden die Zellhaufen durch Zugabe von 25 µl 0,05% Trypsin/EDTA bei 37°C vereinzelt. Die Behandlung wurde mit 50 µl ES-Zell-Medium gestoppt. Die Zellen wurden auf eine mit einer dichten MEF-Kultur bewachsenen 96-Well-Kulturplatte transferiert. Zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und danach erneut mit ES-Zell-Medium versetzt. Eine Hälfte der Suspension wurde auf eine mit 0,5% Gelatine in Wasser vorbehandelte 96-Well-Kulturplatte, die andere Hälfte auf eine mit einer MEF-Kultur bewachsenen 96-Well-Kulturplatte überführt. In der letzteren Platte wurden die Zellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und dann wie folgt eingefroren: Die Zellen wurden mit PBS/5 mM

EDTA gewaschen, trypsiniert und mit 75 µl eiskaltem Einfriermedium (ES-Zell-Medium, 30% FBS, 13,3% DMSO) versetzt. Die Platte wurde mit mehreren Lagen Papiertüchern eingepackt und bei -70°C in einer raumtemperierten Styropor-Kiste eingefroren.

Auf der gelatinisierten 96-Well-Kulturplatte wurden die ES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, um eine möglichst große Zellmenge für die Isolation genomischer DNA zu erzielen. Hier konnte eine frühzeitige Differenzierung in Kauf genommen werden. Mittels Southern-Hybridisierung wurden jene ES-Zellklone identifiziert, in denen das *Targeting*-Konstrukt homolog integriert worden war. Die korrespondierende Kulturen wurden schnell aufgetaut und jeweils in eine 35 mm-Schale überführt.

2.1.4 Kultur und transiente Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre in DMEM mit 10% FBS, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert und jeden dritten Tag im Verhältnis 1:10 gesplittet. Sie wurden mit der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode transfiziert [nach (Chen and Okayama, 1987)]. Dazu mußten die Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 60 mm-Schale ausgesät werden. Die zu transfizierenden Plasmide waren gereinigt (über eine Anion-Austausch-Säule, Quiagen) und hatten üblicherweise eine Konzentration von 1 µg/µl. Ihre Gesamtmenge betrug 10 µg einschließlich 2 µg RSV-β-Gal als interne Kontrolle. Eine Schale wurde mit 1 µg pDS-Red2-N1 zur Kontrolle der Transfektionseffizienz parallel transfiziert. Gegebenenfalls wurde die DNA-Menge mit pUC19 aufgefüllt. Die Plasmide wurden mit 25 µl 2,5 M sterilfiltriertem CaCl_2 und 215 µl aqua bidest. vermischt. Dazu wurden 250 µl 2xBBS (50 ml: 0,53 g BES [Sigma cell culture grade], 2,8 ml 5 M NaCl, 0,5 ml 0,15 M Na_2HPO_4 [frisch angesetzt: 1,065 g Na_2HPO_4 (Sigma cell culture grade) in 50 ml aqua bidest.] in 45 ml aqua bidest., pH-Wert auf 6,95 – 6,97 mit NaOH eingestellt [Der pH-Wert war für eine hohe Transfektionseffizienz sehr kritisch und mußte jeweils neu austitriert werden.] und schließlich mit aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt und steril filtriert) gegeben, die Lösung gemischt und bei RT für 20 min nicht bewegt. Danach wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Kulturschale verteilt und die Zellen über Nacht in einer 3%igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Transfektionseffizienz abgeschätzt und bei erfolgreicher Transfektion (mindestens 50 % Transfektionseffizienz) wurde das Medium entfernt, die Zellen zwei Mal mit TBS (10 mM Tris-Cl [pH 7,5], 150 mM NaCl) gewaschen und mit frischem Medium weitere 24 h in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert.

2.2 Etablierung von EMA/E2F-6-defizienten Mäusen

2.2.1 Superovulation von Weibchen und Isolation von Blastozysten

Um möglichst eine große Anzahl von Blastozysten zur Injektion der rekombinanten ES-Zellklone gewinnen zu können, wurden 20 – 23 Tage alte Weibchen des Stammes C57BL/6J superovuliert [nach (Hogan, et al., 1994)]. Dazu wurden den Mäusen zuerst 100 µl 50 U/ml „Pregnant Mare’s Serum“ (= Intergonan, Intervet GmbH, Tönisvorst) in PBS intraperitoneal injiziert. Das Serum enthält Follikel-stimulierendes Hormon (FSH). Zwei Tage später erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100 µl 50 U/ml hCG (humanes Chorion-Gonadotropin = Ovogest, Intervet GmbH, Tönisvorst) in PBS und die Verpaarung mit C57BL/6J-Männchen. Das Auffinden eines Vaginalpfropfes am Morgen wurden mit einer erfolgten Kopulation gleichgesetzt (0,5 p. c.). Am

Tag 3,5 p. c. wurden die Weibchen durch Zervixdislokation getötet, die Uteri zusammen mit den Eierstöcken und den Eileitern präpariert und die Blastozysten durch Einstechen einer Mundglaskapillare kurz unterhalb des Eileiters mit Blastozysten-Medium (10% FBS [Biochrom, Berlin], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x nicht essentielle Aminosäuren [Invitrogen], 5 mM β -Mercaptoethanol [Invitrogen], 30 mM HEPES pH 7,2 in DMEM mit Glutamax [Invitrogen]) aus den Uteri gespült. Die Blastozysten wurden bis zur Injektion mit Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) überschichtet und bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten

Die Injektion erfolgte nach (Bradley and Robertson, 1986). In die Injektionskammer wurden ca. 2000 – 2500 ES-Zellen in einem Tropfen Blastozysten-Medium vorgelegt, mit Silikonöl DC200 überschichtet und 20 – 30 Blastozysten mit einer Mundkapillare zugegeben. Anschließend erfolgte die Injektion von 16 - 20 ES-Zellen in eine Blastozyste an einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit einem seitlich befestigtem Mikromanipulator (Brindi AG, Basel bzw. Eppendorf, Hamburg). Halte- und Injektionsnadeln wurden von Eppendorf bezogen. Gelegentlich mußte eine Verstopfung der Injektionsnadel mit 300 U/ml DNase I bzw. Proteinase K behoben werden.

2.2.3 Uterustransfer von Blastozysten

Der Transfer der injizierten Blastozysten in die Ammenweibchen wurde im Anschluß an eine mehrstündige Inkubation bei 37°C durchgeführt, um eine Weiterentwicklung der Blastozysten absichern zu können. Die Blastozysten wurden in 8 – 35 Wochen alte scheinschwangere CB6F1-Weibchen transferiert (Hogan, et al., 1994). Dazu mußten die Weibchen mit sterilen *c-ros*^{-/-}-Männchen (Sonnenberg-Riethmacher, et al., 1996) verpaart werden. Nach einer solchen Verpaarung durchlaufen die Weibchen alle hormonellen Veränderungen einer Schwangerschaft und sind deshalb für die transferierten Blastozysten empfänglich. Da die Blastozysten (Ed 3,5) durch die Manipulation eine Entwicklungsverzögerung erfahren haben, wurden sie in Tag 2,5 p. c. scheinschwangere Weibchen transferiert. Für den Uterustransfer wurden die Weibchen durch intraperitoneale Injektion von 50 µl 2% Xylazin-100 µg/ml Ketavet-Lösung pro 25 g Körpergewicht (120 µl Xylazin [Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf], 340 µl Ketavet [Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Pharmacia & Upjohn, Erlangen], 540 µl 0,9% NaCl auf 1 ml) narkotisiert und die Uteri operativ freigelegt. Am Übergang zum Infundibulum wurden sechs bis acht Blastozysten mit einer Mundkapillare in jede Uteruseite transferiert. Anschließend wurde das Peritoneum (Bauchfell) vernäht und das Oberfell mit Autoclips geklammert (9 mm Wundclips, Becton Dickinson Biosciences).

2.2.4 Maushaltung

Die Mäuse waren in den Tierställen der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité untergebracht. Sie wurden in einer konventionellen Haltung in fensterlosen Räumen in Plastikäfigen Typ II und III unter Filterhauben gehalten. Sie hatten einen konstanten 12 h Licht-Dunkelheit-Rhythmus. Als Einstreu dienten feine Holzspäne (altromin, Lage, Deutschland). Haltungsfutter in Pelletform (ssniff, Soest, Deutschland) und frisches Wasser waren *ad libitum* verfügbar.

2.2.5 Genotypisierung

2.2.5.1 Isolation von genomischer DNA

Mittels einer Kofferdam-Lochzange (Ainsworth, Aesculap Baun Melsungen, Tuttlingen) wurden den Mäusen Ohrgewebstückchen einer Größe von ca. 1 mm Durchmesser entnommen, die gleichzeitig zur Kodierung der Mäuse dienten. Das Gewebe wurde mit 47 µl Gewebelysepuffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) und 3,25 µl 20 mg/ml Proteinase K (einmalig aktiviert durch 10 min Inkubation bei 37°C) versetzt, mit zwei Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und über Nacht bei 55°C geschüttelt. Nach der Zugabe von 17 µl 5 M NaCl wurde die Reaktion 15 s auf dem Vortex geschüttelt. Gewebereste und denaturierte Proteine wurden bei einer 15 min Zentrifugation mit 12.000 rpm abgetrennt. Die genomische DNA wurde mit 200 µl –20°C kaltem absoluten Ethanol aus der wässrigen Phase geschüttelt und 10 min bei 10.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die kurz luftgetrocknete DNA wurde in 25 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8, 1 mM EDTA) über Nacht resolubilisiert.

2.2.5.2 Genotypisierungs-PCR

Der Genotyp einer Maus wurde jeweils mit zwei unabhängigen PCR bestimmt (Abb. 6 und 8). Als Reaktionskomponenten wurden gemischt:

| | | |
|-----------|---|---|
| 5 µl | 10x Reaktionspuffer (Amersham Bioscience) | |
| 1 µl | 10 mM 4dNTP (Amersham Bioscience) | |
| 0,4 µl | 5 U/µl Taq-Polymerase (Amersham Biosc.) | |
| 0,25 µl | 100 pmol/µl <i>Sense</i> -Oligonukleotid (metabion) | (2-Primer PCR: MP-54; 3-Primer PCR: MP-67, MP-40) |
| 0,25 µl | 100 pmol/µl <i>Antisense</i> -Oligonukleotid | (2-Primer PCR: MP-55; 3-Primer PCR: MP-56) |
| 500 ng | genomische DNA | |
| auf 50 µl | <i>aqua bidest.</i> auffüllen. | |

Die folgende gemeinsame PCR wurde in einer PCR-Maschine durchgeführt: 5 min 94°C - 30 Reaktionszyklen: 0,5 min 94°C, 0,5 min 59°C, 2 min 72°C – 5 min 72°C. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel aufgetrennt.

2.3 Tierexperimente

Die Tierexperimente wurden unter Beachtung des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien des Landesamts für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin durchgeführt.

2.3.1 Narkose und Tötung

Die Mäuse wurden für den Uterustransfer der Blastozysten und die retrobulbäre Blutentnahme mit einem Gemisch von 150 mg/1000 g Körpergewicht 100 mg/ml Ketavet (Ketaminhydrochlorid, Pharmacia & Upjohn, Erlangen) und 10 mg/1000g Körpergewicht 2 % Xylazin (Xylazinhydrochlorid, Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf) in einer 0,9%igen NaCl-Lösung narkotisiert. Für die Perfundierung wurden sie mit einer erhöhten Menge narkotisiert: 200 mg/1000 g Ketavet und 16 mg/1000g Xylazin. Den neugeborenen Mäuse wurden für die Skelettpräparation eine tödliche Dosis von 600 µg/1000g Ketavet gegeben. Zusätzlich wurden sie im Anschluß an die Injektion auf Eis gelegt.

Üblicherweise sind die Mäuse durch Zervixdislokation getötet worden. Die neugeborenen Nachkommen der chimären Mäuse, die aufgrund ihrer Fellfärbung als Wildtyp identifiziert werden konnten, sind mittels Dekapitation mit einer Schere getötet worden.

2.3.2 Perfundierung

Um eine Schädigung des Nervengewebes zu verhindern, wurden die narkotisierten Mäuse vor der Präparation mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (16 g PFA in 200 ml *aqua bidest.* + 200 µl 1 N NaOH bei 65°C gelöst, 200 ml 200 mM Na₂HPO₄ zugegeben und mittels eines Papierfilters filtriert) perfundiert. Dazu wurde ihr Brustkorb geöffnet, in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens eine Kanüle gestochen und der rechte Vorhof zu einem Abfluss aufgeschnitten. Zuerst wurden das Blut aus dem Kadaver vorsichtig mit ca. 15 ml PBS gespült. Danach wurden die Kadaver mittels eines medizinischen Tropfes tropfenweise für 1 h perfundiert.

2.3.3 Skelettpräparation

Für die Skelettanalyse wurde die Skelette von ein bis zwei Tage alten Mäusen präpariert. Zuerst wurden die getöteten Mäuse mit zwei feinen spitzen Pinzetten (Dymont Nr. 5 Standard, Dymoxel 11 cm) vollständig gehäutet, die Fettpolster besonders im Schulter- und Halsbereich und die inneren Organe des Brust- und Bauchraumes entfernt. Die Haut wurden für die Genotypisierung verwendet. Die Körper wurden einen Tag lang in absoluten Ethanol auf einem Schwenktisch und bei RT fixiert. Danach wurden die knorpeligen und knöchernen Anteile zwei bis vier Tage im Dunkeln und unter Schwenken mit Alican Blau und Alizarin Rot S (33 ml Alican-Stocklösung [0,14 %/V Alican Blau (Sigma) in 70% Ethanol], 33 ml Alizarin-Stocklösung [0,06 %/V Alizarin Rot S (Sigma) in 95% Ethanol], 574 ml absoluter Ethanol, 246 ml *aqua bidest.*, 131 ml Eisessig) gefärbt. Nachdem die Färbelösung abgegossen war, wurden die weichen Gewebe für einige Stunden in einer 1,8%igen KOH-Lösung unter ständiger Kontrolle verdaut gefolgt von einer Behandlung mit einer 0,3%igen KOH-Lösung für zwei Tage. Die Klärung der Skelette erfolgte in einer steigenden Glycerinreihe jeweils bis sie auf den Gefäßboden gesunken waren beginnend mit 60% und endend bei 90% Glycerin. Darin wurden die Präparate auch gelagert und mit einem Stereomikroskop (Zeiss) analysiert.

2.3.4 Rota-Rod-Untersuchung

Es wurde ein Rota-Rod mit elektromechanischer Zeitnahme (Ugo Basile, Model 7650, Italien) benutzt (Abb.3). Die Mäuse konnten sich auf der rotierenden Walze 1 min auf die veränderte Situation einstellen. Danach wurde mit der Zeitmessung begonnen und die Rotation auf Beschleunigung (von 27 rpm und endend bei 42 rpm) umgestellt. Ein Versuch dauerte maximal 300 s. Wenn sich eine Maus diese gesamte Zeit auf der Walze halten konnte, wurde der Versuch mit 300 s gewertet. Insgesamt wurden jeweils fünf Versuche infolge durchgeführt. Zwischen diesen war 3 min Pause. Eine Umdrehung der Maus mit der Walze wurde als Fehler gewertet und der Versuch daraufhin abgebrochen; gegebenenfalls konnte eine geschickte Maus deshalb nicht in dieser Versuchsreihe eingesetzt werden.

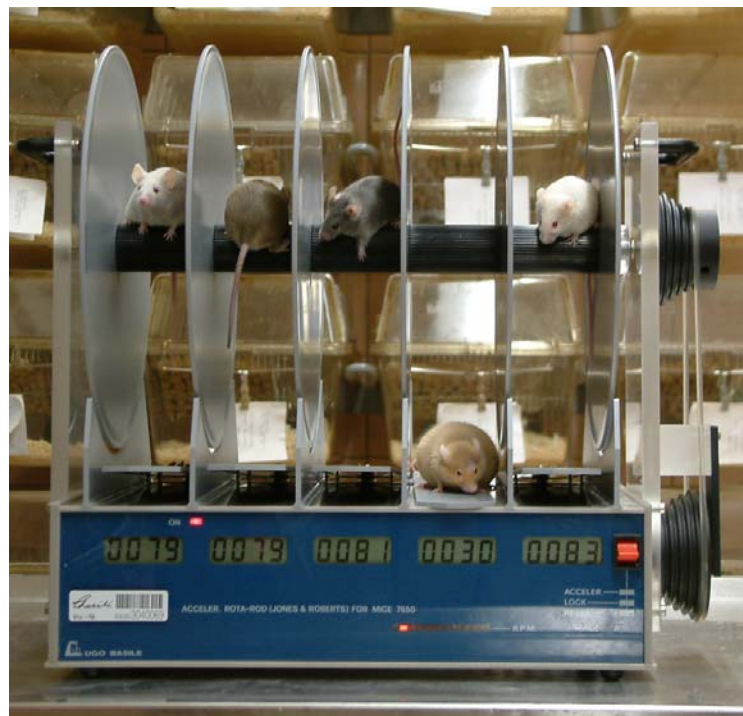


Abb. 3: Rota-Rod der Firma Ugo Basile, Model 7650.

2.3.5 Fettreiche Diät

Dafür wurde ein Trockenfutter in Pelletform mit einem zehnfach höheren Rohfettanteil *ad libitum* gefüttert (Experimentalfutter EF 1/22, ssniff, Soest, Deutschland). Während dieses Experiments wurde das Einstreu im Käfig reduziert, um heruntergefallenen Futterbrocken wiederzufinden und in die Verbrauchswägung einfließen lassen zu können.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Southern-Hybridisierung

Die mittels enzymatischer Endonukleasereaktion fragmentierte genomische DNA wurde im 0,6%igen Agarosegel über ca. 24 h bei 30 – 40 V aufgetrennt. Sie wurde anschließend mittels Kapillartransfer auf eine neutrale Nylonmembran (Schleicher&Schuell) transferiert. Dazu wurde das Gel kurz in *aqua bidest.* gewaschen und dann für 1 h in Denaturierungspuffer (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) geschüttelt; der Puffer wurde zwischenzeitlich gewechselt. Nach einem Waschschrift wurde das Gel 30 min in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris, 3 M NaCl) inklusive Pufferwechsel geschüttelt. Es wurde erneut kurz gewaschen. Anschließend wurde die für 10 min in 20x SSC vollgesaugte Membran direkt auf das Gel gefolgt von zwei ebenfalls vollgesaugten Lagen Filterpapier (Whatman) und vielen trockenen Papierhandtüchern gelegt. Der Turm wurde mit einer Platte und einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Am nächsten Tag wurde die DNA auf der nur angetrockneten Membran durch UV-Lichtbestrahlung (Stratalinker, Stratagene, Programm „Autocrosslink“) immobilisiert.

Als Sonden dienten zum betreffenden Gen homologe und klonierte DNA-Fragmente: I) Identifizierung des langen Arms des *Targeting* Vektors und 3'-Sonde zur Identifizierung der homolog rekombinanten ES-Zellklone: In4-1292 aus dem Plasmid pCR4Topo-In4-1292, II) 5'-Sonde zur Verifizierung der rekombinanten ES-Zellklone: In1-790 aus pUC19-In1-790. Die isolierten Fragmente wurden mit [α - 32 P]-dCTP mithilfe des „Oligo labeling kits“ (Amersham Bioscience) radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit einer TE-equilibrierten Nick-Säule (G-50 Sepharose, Amersham Bioscience) gereinigt (siehe Kapitel 2.4.6 „Gelretardationsexperiment“). Bevor die hitzdenaturierte Sonde auf die Membran gegeben werden konnte, wurde diese 2 h mit 20 ml 6x SSC, 5x Denhardt's, 0,1% SDS und 2 mg denaturierter Lachssperma-DNA (Amersham Bioscience) bei 64°C im Rollenofen (Biometra) vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Die Membran wurde mit jeweils 100 ml 2x SSC für 15 min, dann zweimal für je 10 min mit 0,1x SSC und 0,1% SDS gewaschen, getrocknet und einem Röntgenfilm wie in Kapitel 1.4.3 „*RNase Protection Assay*“ beschrieben exponiert.

2.4.2 Isolation von Gesamt-RNA

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Um RNA aus Zellkulturen zu isolieren, wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in einer dem Kulturschalendurchmesser angepassten kleinen Menge kaltem PBS abgeschabt. Das PBS wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurde ein tiefgefrorenes Gewebestückchen in einem tiefkalten Mörser auf Trockeneis zerrieben. Das Gewebepulver bzw. das Zellpellet wurden in 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen) solange resuspendiert, bis eine homogene Suspension vorgelegen hat. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurde die Suspension auf dem Vortex geschüttelt und einige wenige Minuten bei RT inkubiert. Die Trennung der wässrigen von der organischen Flüssigkeitsphase erfolgte bei einer 15 min Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g. Die obere Phase wurde mit 1 ml 80%igem Ethanol versetzt und gemischt. Die RNA wurde bei einer 5 min Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g pelletiert. Das Pellet wurde kurz bei RT getrocknet und in 50 μ l *aqua bidest.* gelöst. Die Qualität der RNA wurde in einem Formaldehyd-Agarosegel beurteilt.

2.4.3 RNase Protection Assay

Als Sonden wurden Gegenstrangtranskripte benutzt, die in folgender *in vitro* Run off-Transkriptionsreaktion radioaktiv markiert wurden:

| | |
|---------|--|
| 50 ng | linearisiertes Matritzenplasmid (über ein Agarosegel gereinigt [„QIAquick Gel Extraktionskit“, Quiagen]) |
| 1 µl | 20 U/µl RNA-Polymerase (Roche Diagnostics) |
| 1,5 µl | 10x Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics) |
| 1,5 µl | 100 mM DTT (Invitrogen) |
| 1 µl | 10 mg/ml BSA (New England Biolabs) |
| 0,5 µl | 10 mM ATP, GTP, UTP (Amersham Bioscience) |
| 0,75 µl | 40 U/µl RNasin (Promega) |
| 8 µl | 800 Ci/mmol [α - ³² P]GTP (NEN PerkinElmer, Boston). |

Die Reaktion wurde je nach Sondenlänge bis zu 1,5 h bei 37°C bzw. 40°C inkubiert. Die DNA-Matrize wurde danach mit 2 µl 1 U/µl RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics) bei einer 30 min Inkubation bei 37°C abgebaut. Es wurden 2 µl 10 µg/µl tRNA aus *Escherichia coli* als Fällhilfe, 181 µl *aqua bidest.* und 250 µl Isopropanol dazugegeben, das Transkript bei einer 15 min Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g präzipitiert und dann in 50 µl *aqua bidest.* gelöst. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 750 µl kaltem 75%igem Ethanol gewaschen und in 30 µl Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics) gelöst. Die Menge des radioaktiven Transkriptes wurde mittels 10 µl einer 1:100-Verdünnung in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) mit einem Szintillationsmessgerät (Wallac, PerkinElmer) bestimmt.

Für den RPA wurden Reagenzien aus dem „RNase Protection Kit“ (Roche Diagnostics) eingesetzt. 10 – 20 µg Gesamt-RNA wurden mit 2×10^5 cpm Sonde in insgesamt 30 µl Hybridisierungspuffer über Nacht bei 55°C hybridisiert. Dazu mußte der Hybridisierungsansatz vorher mit Mineralöl überschichtet und die RNA-Sekundärstrukturen 5 min bei 90°C aufgelöst werden. Einzelsträngige RNA-Abschnitte wurden 1 h bei 30°C in 350 µl RPA-Verdaupuffer mit 1 µl 3,5 mg/ml RNase A und 2,5 µl 10 U/µl abgebaut. Die RNasen wurden mit 20 µl 10% SDS und 2,5 µl 20 mg/ml Proteinase K bei einer 15 min Inkubation bei 37°C und anschließenden Extraktion mit 400 µl Phenol-Chloroform zu gleichen Teilen entfernt. Die RNA-Hybride in der wässrigen Phase wurden in Gegenwart von 2 µl 20 mg/ml Glykogen (Roche Diagnostics) mit 1 ml kaltem absolutem Ethanol nach einer 30 min Inkubation bei –20°C mit einer 15 min Zentrifugation mit 12.000 g bei 4°C pelletiert. Die RNA wurde in 6 µl RNA-Ladepuffer (80% Formamid, 0,1% Xylencyanol, 0,1% Bromphenol Blau, 2 mM EDTA) aufgenommen und in einem 4 – 8%igem denaturierenden Polyacrylamid-Sequenzierungsgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem beheizten Geltrockner (Slab Gel Dryer 4050, Sarvant) vollständig getrocknet und damit über Nacht ein Röntgenfilm (X-Omat Blue, Kodak) inklusive Intensivierungsschirm bei –80°C exponiert. Die quantitative Auswertung der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers (FLA-3000, FujiFilm) und dem Programm Aida Image Analyser v. 3.11 (raytest Isotopenmessgeräte, Berlin) vorgenommen.

2.4.4 RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 13 µl mit 1 µl Oligo-dT (Invitrogen) für 10 min bei 70°C inkubiert und danach für 1 min auf Eis abgekühlt. Dazu wurde für die vergleichende RT-PCR ein Mastermix bestehend aus 4,5 µl 5x Erststrangpuffer (Invitrogen), 1 µl 10 mM 4dNTP (Amersham Bioscience), 2 µl 100 mM DTT (Invitrogen), 1 µl 200 U/µl SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben, das Gemisch erst 10 min bei RT und dann für 50 min bei 40°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer 10 min Inkubation bei 70°C beendet. Die RNA wurde mit 1 U RNase H (Invitrogen) bei einer 20 min Inkubation bei 37°C abgebaut.

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit in einer PCR-Maschine in folgender PCR amplifiziert: 5 min 94°C – 30 Zyklen: 1 min 94°C, 1 min Oligonukleotid-abhängige Synthesetemperatur, 2 min 72°C – 5 min 72°C. Als Reaktionskomponenten wurden gemischt:

| | |
|-----------|---|
| 3 µl | cDNA |
| je 0,5 µl | 100 pmol/µl <i>Sense</i> - und <i>Antisense</i> -Oligonukleotid (metabion, Planegg-Martinsried) |
| 0,4 µl | 5 U/µl Taq-Polymerase (Amersham Bioscience) |
| 5 µl | 10x PCR-Puffer (Amersham Bioscience) |
| 1 | 25 mM MgCl ₂ |
| 1 µl | 10 mM 4dNTP (Amersham Bioscience) |
| 39,6 µl | <i>aqua bidest.</i> |

2.4.5 Immunoblot

Um Gesamtzell-Proteinextrakte für einen Immunoblot aus Zellkulturen zu präparieren, wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in einer dem Kulturschalendurchmesser angepassten kleine Menge kaltem PBS abgeschabt. Das PBS wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Um Gesamtzell-Proteinextrakte aus Gewebe zu präparieren, wurde ein tiefgefrorenes Gewebestückchen in einem tiefkalten Mörser auf Trockeneis zerrieben. Das Gewebepulver bzw. das Zellpellet wurden in einer minimalen Menge RIPA-Puffer (1% Nonidet P-40, 0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, in PBS) aufgenommen und mit zwei bis drei 3 s-Ultraschallbehandlungen (Vibra Cell; Sonics & Materials, Connecticut, USA) aufgeschlossen. Zwischen den Behandlungen wurde die Ansätze auf Eis gekühlt. Die relativen Proteinmengen des Extraktes wurden nach einer Methode, die auf einer Reaktion von Protein mit dem basischem Kupferatrat und dem Folinreagenz basiert (Lowry, et al., 1951), entsprechend den Ausführungen des Herstellers (DC Protein Assay, Bio-Rad) bestimmt.

5 bis 10 µg Proteinextrakt wurden in einer entsprechenden Menge 4x Ladepuffer (Roti-Load 1, Roth) aufgenommen, 3 min bei 95°C denaturiert und direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch mittels Transferpuffer (20% Methanol/ 25 mM Tris/ 190 mM Glyzin) bei 4°C auf eine PVDF-Membran (PVDF Western Blotting Membrane, Roche Diagnostics) im Tankblotverfahren transferiert. Dazu wurde eine Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) benutzt. Der Transfer lief 1 h bei 80 V ab und konnte anhand des vorgefärbten Proteinstandards kontrolliert werden. Um unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu reduzieren, wurde der Blot mindestens 30 min in einer 20%igen Magermilchlösung (Einzelhandel) in TTBS (1 M Tris-Cl, pH 7,5, 1,5 M NaCl, 10% Tween) blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (LLF6-1, LLF6-2, monoklonal, Maus, J. Lees, MIT Boston) in der Magermilchlösung wurde

üblicherweise über Nacht bei 4°C rotierend durchgeführt. Schwach und nicht gebundener Antikörper wurde in drei 10 min Waschschritten bei RT mit TTBS auf dem Schüttler abgewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugiertem polyklonalem Zweitantikörper (Cytomation EnVision Peroxidase, anti-Maus, DakoCytomation) ebenfalls rotierend bei RT für 1 h. Überschüssiger Antikörper wurde wie oben abgewaschen. Die Entwicklung des Blotes mittels Chemolumineszenz erfolgte für 1 min (Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus, NEN PerkinElmer), und die Signale wurde durch eine kurze Exponierung eines Röntgenfilms (X-Omat Blue, Kodak) sichtbar gemacht.

Um β -Aktin als Gelladungskontrolle auf dem selben Blot nachzuweisen, wurde dieser kurz in TTBS gewaschen, neu blockiert und mit Antikörpern (anti- β -Actin, Maus, Klon AC-74, Sigma; anti-Maus IgG [Fc-spezifisch], Sigma) wie oben beschrieben inkubiert.

2.4.6 Gelretardationsexperiment

Für Gelretardationsexperimente wurden Gesamtzell-Proteinextrakte exakt nach dem Protokoll von (Nevins, et al., 1997) und nukleäre sowie zytoplasmatische Extrakte nach den Protokollen von (Leone, et al., 1998) präpariert. Die relativen Proteinmengen wurden nach einer Methode bestimmt, die darauf basiert, dass das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Proteinbindung von 465 nm zu 595 nm wechselt (Bradford, 1976). Dafür wurden 1 μ l Extrakt mit 200 μ l Bradford-Reagenz (Bio-Rad) und 800 μ l *aqua bidest.* gemischt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Referenzwert diente die Extinktion des Gemisches ohne Extrakt.

Als Sonde diente ein 66 nt-langes doppelsträngiges Oligonukleotid (Wt: MP-70/MP-71, E2Fmut: MP-72/MP-73) aus dem *TUBA7*-Promotor der Maus mit der E2F-Bindungsstelle zentral. Die Sonde wurde zum Nachweis mit folgender Reaktion 32 P-endmarkiert:

| | |
|------------|---|
| 1 μ l | 100 ng/ μ l Oligonukleotid (Einzelstrang) |
| 2 μ l | 10x Polynukleotidkinase-Puffer (Roche Diagnostics) |
| 1 μ l | 10 U/ μ l T4-Polynukleotidkinase |
| 5 μ l | 3000 Ci/mmol [γ - 32 P]ATP (NEN PerkinElmer, Boston) |
| 11 μ l | <i>aqua bidest.</i> |

Das Gemisch wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert, danach mit 80 μ l TE-Puffer aufgefüllt und die Sonde mit einer TE-equilibrierten Nick-Säule (G-50 Sepharose, Amersham Bioscience) gereinigt. Dazu wurden auf die Säule nach dem Sondenreaktionsgemisch zweimal 400 μ l TE-Puffer geladen, wobei die Tropfen drei bis fünf der zweiten 400 μ l aufgefangen wurden. Die Radioaktivität der Markierung wurde wie im Kapitel 2.4.3 „*RNase Protection Assay*“ beschrieben bestimmt. Anschließend wurde das radioaktiv markierte einzelsträngige Oligonukleotid mit dem Gegenstrang hybridisiert, indem zu der Markierungsreaktion 300 ng Oligonukleotid und 3,2 μ l 1 M NaCl zugegeben wurden, das Reaktionsgefäß in ein kochendes Wasserbad gestellt und beides zusammen bei RT für 2 h abgekühlt wurde.

Folgende Bindungsreaktion wurde angestrengt:

| | |
|-----------------------|--|
| 2 – 4 μ g | nukleärer und zytoplasmatischer Extrakt bzw. |
| 6 – 8 μ g | Gesamtzell-Extrakt |
| 4x10 ⁵ cpm | doppelsträngige Oligonukleotid-Sonde |
| 1,2 μ l | 5x Shift-Puffer (100 mM Hepes-KOH, pH 7,9, 200 mM KCl, 30 mM MgCl ₂ , |

| | |
|---------------|--|
| | 5 mM EGTA, 5 mM DTT, 5 mM Pefablock [Roche Diag.], 0,5% NP-40) |
| 0,1 µl | 100 mM DTT |
| 1,5 µl | 10 mg/ml BSA (New England Biolabs) |
| 0,5 µl | 1 mg/ml Lachssperma-DNA (Amersham Bioscience) |
| 1 µl | Ficoll |
| in 10 – 12 µl | <i>aqua bidest.</i> |

Gegebenenfalls wurden außerdem 2 µl Antikörper (monoklonal anti-HA, anti-Ratte, Klon 3F10, Roche Diagnostics; anti-DP-1, MS-255-P0, Maus, NeoMarkers, Fremont, USA; anti-E2F-4 (C-20), SC-866, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology) dazugegeben, und die Reaktion 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde direkt auf ein TBE-Acrylamidgel (5% 40%-Acrylamid, 5% Glycerol, 0,5x TBE [90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA], dass seit dem Vortag bei 4°C equilibrierte, geladen. Der Gellauf fand in 0,5x TBE bei 4°C und 150 V für 5,5 h statt. Danach wurde das Gel wie im Kapitel 2.4.3 „*RNase Protection Assay*“ getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert.

2.4.7 Reporter-Gen-Assays

Reporter-Gen-Assays wurden mit transient transfizierten Zellen durchgeführt. MEF wurden mit 1 µg und HeLa-Zellen mit 250 ng *TUBA3*-Luziferasereporter-Gen-Plasmid transfiziert (siehe Kapitel 2.1 „Zellkultur“). Für die Ernte wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in einer dem Kulturschalendurchmesser angepassten kleinen Menge kaltem PBS abgeschabt. Das PBS wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 100 – 150 µl Reporter-Gen-Lysepuffer (Promega) aufgeschlossen, indem sie solange auf dem Vortex geschüttelt wurden, bis keine Zellaggregate mehr sichtbar waren. Der Aufschluss wurde durch einen anschließenden Gefrier-Tau-Schritt unterstützt. Zelltrümmer wurden mit einer 3 min Zentrifugation bei 4°C und 7.500 rpm pelletiert. 20 µl des Lysats wurden direkt für die Bestimmung der Luziferaseaktivität in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) eingesetzt. Als Enzymsubstrat wurden automatisch 50 µl Luziferin (Promega) injiziert und die Lichtemission während 30 s gemessen. Zur Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurden 3 µl Mg-Lösung (100 mM MgCl₂, 4,5 M β -Mercaptoethanol), 66 µl 1x ONPG (4 mg/ml *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid gelöst in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,5) und 201 µl 100 mM Natriumphosphat, pH 7,5 in eine 96-Well-Kulturplatte vorgelegt und 30 µl Lysat zugegeben. Bei schnellem Farbumschlag wurde die Reaktion mit 1:5- bzw. 1:10-verdünnten Lysat wiederholt. Im entgegengesetzten Fall wurde die Reaktion bei 37°C inkubiert. Die Extinktion der enzymatischen Reaktion wurde mit einem Mikroplatten-Lesegerät (Dynatech MR5000, Long Island Scientific, New York) bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt und mit der entsprechenden Luziferaseaktivität in das Verhältnis gesetzt.

2.4.8 Rekombinante Mutagenese des *TUBA3*-Promotors in pGL3Basic-*TUBA3*

Die E2F-Bindungsstelle des *TUBA3*-Promotors im Reporter-Gen-Plasmid pGL3Basic-*TUBA3* wurde mittels rekombinanter PCR punktmutiert (TTCCCGCCAA → TTCTTAAGAA, pGL3Basic-*TUBA3*-E2Fmut) und deletiert (pGL3Basic-*TUBA3*-delE2F) (Abb. 4). Dafür wurden jeweils Oligonukleotide, die zentral die Mutation trugen, in der PCR eingesetzt. Zuerst wurde das Promotorfragment mit zwei PCR in zwei Teilfragmenten amplifiziert, wobei jeweils ein Oligonukleotid an der E2F-Bindungsstelle hybridisierte (PCR I/1 und I/2 in Abb.

4). Beide Produkte wurden zusammen als Matrize für die Synthese des gesamten Fragments mit den zum Fragmentrand komplementären Oligonukleotiden verwendet (PCR II in Abb. 4). Das gebildete Produkt wurde in den Ausgangsvektor pGL3-Basic (Promega) über die Erkennungsstellen der Endonuklease Hind III kloniert. Das Plamidinsert wurde zur Überprüfung der Sequenz und der Mutation automatisch sequenziert (LiCor DNA Sequencer Model 4000, MWG Biotech).

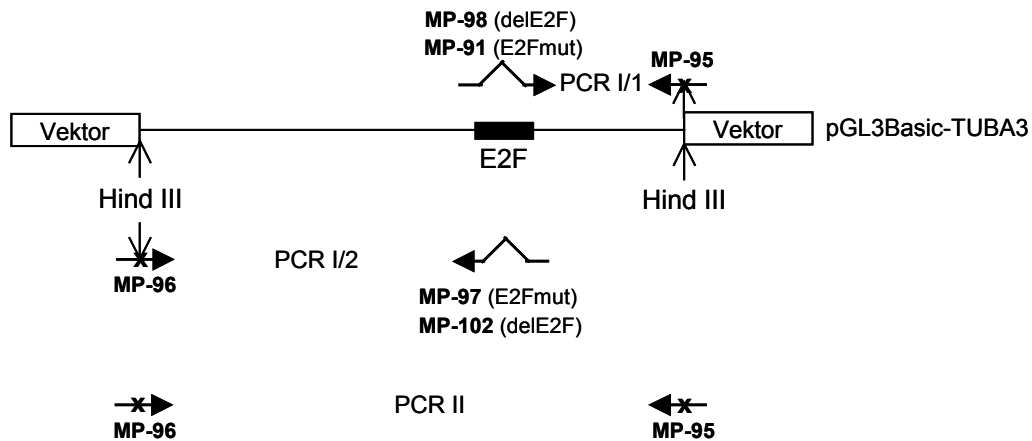


Abb. 4: Schema der Mutagenesestrategie der E2F-Bindungsstelle im *TUBA3*-Promotor mittels zwei aufeinander aufbauender PCR. Als PCR-Matrize diente der Vektor mit dem Wildtyp-Promotor pGL3Basic-TUBA3. Dargestellt sind das Promotorfragment, das über Erkennungssequenzen für Hind III kloniert worden ist, mit der zentralen E2F-Bindungsstelle (E2F) und flankierende Vektorabschnitte (Vektor). Die gefüllten Pfeile repräsentieren die Oligonukleotide der PCR mit ihren Bezeichnungen. Die Winkel in einigen Pfeilen stellen die E2F-Mutation (Punktmutation [E2Fmut] bzw. Deletion [delE2F]) in den zur E2F-Bindungsstelle komplementären Oligonukleotiden dar.

2.4.9 DNA-Mikroarray

Mittels eines DNA-Mikroarrays sind die Expressionsprofile von jeweils einer EMA/E2F-6^{-/-}-MEF-Kultur und einer Wildtyp-MEF-Kultur in der Wachstumsphase und in der G₀-Phase des Zellzyklus (Kapitel 2.5.4 „Synchronisierung von MEF in der G₀-Phase des Zellzyklus“) erstellt worden. Für die Herstellung des Sondengemisches wurde Gesamt-RNA nach der in Kapitel 2.4.2 „Isolation von Gesamt-RNA“ präpariert. Die Herstellung der Sonden, die Hybridisierung des genomischen DNA-Mikroarrays der Maus (U74Av2, Affymetrix) und die Auswertung der Signale einschließlich der Statistik wurden von Servicelabor für Funktionelle Genomforschung der Charité-Universitätsmedizin Berlin (LFGC) durchgeführt. Für jede Zellpopulation wurde eine Hybridisierung durchgeführt. Die Expression von Genen, die in mutierten und Wildtyp-MEF unterschiedlich hoch war, wurde mit einer anderen RNA-Analysemethode von Frau U. Frede mit unabhängig präparierten MEF überprüft.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Durchflussszytometrie

Für die Bestimmung der Zellzyklus-Phase wurde der Kulturüberstand vor der Zellernte gesichert, um auch abgelöste Zellen erfassen zu können. Mediumsreste wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mit einer kleinen Menge 0,05% w/v Trypsin/EDTA (Invitrogen) bei 37°C inkubiert, bis sie begannen, sich selbstständig vom Schalenboden abzulösen. Die Behandlung wurde durch Zugabe des vorher abgenommenen Mediums beendet, alle Zellen vom Schalenboden abgespült und sorgfältig vereinzelt. Gegebenenfalls mußte dem Medium dafür FBS zugefügt werden. Die Zellen wurden 3 min bei 200 g pelletiert, in PBS resuspendiert und nochmals pelletiert.

Um den DNA-Gehalt der Zellen und somit die gegenwärtige Zellzyklus-Phase bestimmen zu können, mußten die Zellen zuerst fixiert und permeabilisiert werden. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml PBS sorgfältig resuspendiert und mäßig stark auf dem Vortex geschüttelt, wobei tropfenweise kalter absoluter Ethanol (Endkonzentration 70%) zugegeben wurde. Die Zellen wurden über Nacht bei 0°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde durch 3 min Zentrifugation bei 4 °C und 400 g abgetrennt. Die Zellen wurden mit 7 ml kaltem PBS gewaschen und ihrer Menge entsprechend mit 200 – 500 µl Propidiumjodid-RNase-Lösung (30 µl 10 mg/ml RNase A, 50 µl 1 mg/ml Propidiumjodid [Sigma], 920 µl PBS) gefärbt. Darin wurden sie 30 min bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Das Fluoreszenzsignal der gefärbten Zellen wurde mittels eines FACScan-Gerätes (Becton Dickinson Biosciences) durchflussszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit den Computerprogrammen CellQuest (Becton Dickinson Biosciences) und Microsoft Excel (Microsoft).

Die Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, wurden identifiziert, indem der Kulturmedium 2 h vor der Zellernte bzw. mit dem Beginn der Serumrestimulation oder im Anschluß an die γ -Bestrahlung 10 µM BrdU (Sigma) zugesetzt wurden. Die Zellen wurden wie oben erläutert geerntet und Ethanol-fixiert. Danach wurden sie mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert, in 1 ml 2 N HCl erneut resuspendiert und bei RT 20 min inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschriff mit 1 ml PBS wurden sie in 1 ml 0,5% w/v BSA (Fraktion V, Roth) in PBS gewaschen. In dieser Lösung erfolgte danach die Inkubation mit dem BrdU-Antikörper (Klon 3D4, 1:20, Becton Dickinson Pharmingen) für 15 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschriff mit der 0,5% BSA/PBS-Lösung wurde die Inkubation mit dem FITC-konjugiertem sekundärem Antikörper (Maus-IgG1, Klon A85-1, Becton Dickinson Pharmingen) unter den gleichen Bedingungen angeschlossen. Überschüssiger Antikörper wurde mit 1 ml 0,5% BSA/PBS gewaschen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt und durchflussszytometrisch analysiert.

2.5.2 Färben von Immunozellen über ihre Oberflächenantigene

Zum Färben von Oberflächenantigenen wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis in 100µl BSA/PBS mit den gewünschten Antikörperlösungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 10-fachen Volumen an PBS/BSA gewaschen und in 250µl PBS/BSA Lösung zur Messung aufgenommen.

1 µl 0,1 mg/ml Propidiumjodid (Sigma) wurde unmittelbar vor der durchflussszytometrischen Analyse (FACS Calibur, Becton Dickinson Biosciences) zugegeben, um lebende von toten oder beschädigten Zellen zu

unterscheiden, da Propidiumjodid nur dann die Zelle anfärben kann, wenn die Membran permeabel geworden ist und so in den Kern eindringen kann.

2.5.3 CFDA-SE-Proliferationsassay

Zur Markierung wurden CD4⁺-Zellen aus der Maus zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 3,5 min in einer 1 µM CFDA-SE (Sigma, St. Louis, USA)/PBS-Lösung in einer Dichte von 1x10⁷ Zellen/µl gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 10% FBS RPMI 1640 Medium gestoppt und die Zellen in einer Zelldichte von 1x10⁷ Zellen/ml im Medium aufgenommen.

Zur Bestimmung der Proliferation mittels des CFDA-SE-Assays wurden 1,65x10⁵ CFDA-SE-markierte CD4-positive T-Lymphozyten und 3,33x10⁵ APC für 48 und 72 h in einer 96-Well-Kulturplatte kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit einem CD3- (Hamster, Klon 145-2C11, Becton Dickinson Pharmingen) und einem CD28-Antikörper (Hamster, Klon 37.51, Becton Dickinson Pharmingen) durch Zugabe während der Aussaat. Nach der Zellernte wurde ca. 2500 – 4000 lebende CD4-positive Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen im Medium mit einem Phycoerythrin-konjugiertem (PE) CD4-Antikörper (DRFZ) für 6 min auf Eis gefärbt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml BSA/PBS gewaschen, 6 min bei 2400 rpm und 4°C zentrifugiert und in 250 µl BSA/PBS resuspendiert. 1 µl 0,1 mg/ml Propidiumjodid wurde unmittelbar vor der Messung (FACS Calibur, Becton Dickinson Biosciences) zugegeben.

Um die zytopetrisch ermittelten Proliferationsdaten der unterschiedlichen Zellpopulationen und der unterschiedlichen Stimulationsansätze untereinander vergleichen und beurteilen zu können, wurden aus den erhalten Bandenmustern der verschiedenen CFDA-SE markierten Zellgenerationen die Zellteilungen unter der Annahme berechnet, dass 10000 CFDA-SE markierte Ausgangszellen (Precusoren) beim Zeitpunkt „Null“ stimuliert wurden. Zur Auswertung wurden die absoluten Zellzahlen der Generationen $i=1$ bis $i=x_i$, dadurch bestimmt, dass man jede einzelne Generation mit einer Region (*Gate*) umfasste, in der man die absolute Zellzahl dieser Generation berechnen lassen konnte. Die unten aufgeführte allgemeine Berechnung der Zellteilungen kann in drei Schritte unterteilt werden:

1. Berechnung der Ausgangszellen ausgehend von der im *Gate* angezeigten Zellzahl.
2. Normierung der real berechneten Precusoren auf 10000.
3. Ermittlung der Zellteilungen.

zu 1. Berechnung der Precusoren:

In der Abb. 5 ist schematisch die Proliferation von CFDA-SE markierten Zellen dargestellt.

$$p_i = \frac{x_i}{2^i}$$

Formel I:

Nachdem nach Formel I die Anzahl der Precusoren errechnet wurde, wird die Summe der Precusoren aller Generationen wie folgt bestimmt:

$$P_s = \sum_{i=1}^{n_i} \frac{x_i}{2^i}$$

Formel II: Summe aller Precusoren (P_s):

zu 2. Normierung auf 10000 Ausgangszellen:

Die anteilige Anzahl der normierten Precusoren (P_N) einer Generation berechnet sich nach Formel III:

$$P_{N_i} = \frac{10000}{P_S} \times p_i$$

Formel III:

zu 3. Berechnung der Zellteilungen:

Die Zellteilungen von 10000 Ausgangszellen werden wie folgt berechnet:

$$Z_{ges} = \sum_{i=1}^{n_i} z_i, \text{ mit } z_i = \sum_{i=1}^{n_i} p_{N_i} \times 2^{i-1}$$

Formel IV:

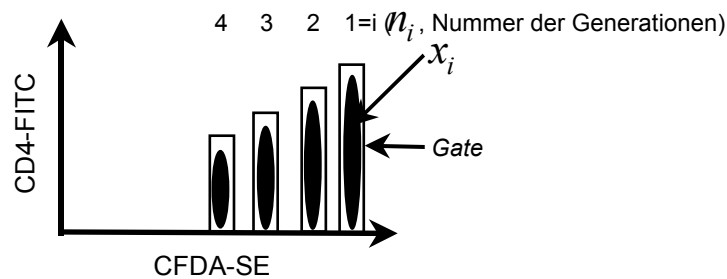


Abb. 5: Schematische Darstellung der CellQuest-Ausgabe von durchflusszytometrisch bestimmten CFDA-SE-markierten Lymphozyten. x_i = Anzahl der in Generation angezeigten Zellen, n_i = Nummer der Generationen

2.5.4 Synchronisierung von MEF in der G_0 -Phase des Zellzyklus

MEF wurden in Anlehnung an das Protokoll von (Ogawa, et al., 2002) in der G_0 -Phase synchronisiert. Dazu wurde das Medium nach drei Tagen Kultur erneuert. Nach weiteren vier Tagen wurde das Medium abgenommen, die jetzt sehr konfluenten Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit einem serumarmen Medium (0,2% FBS) versorgt. Nach 56 h Stunden erfolgte die Restimulation der Kultur mit dem üblichen Medium. Um die Position der Zellen zu bestimmten Zeiten im Zellzyklus bestimmen zu können, wurde dem Medium außerdem 10 μ M BrdU (Sigma) zugegeben.

2.5.5 Gamma-Bestrahlung

$4,2 \times 10^5$ MEF wurden in T25-Kulturflaschen gesät. Zwei Tage später wurden die Zellen mittels einer ^{137}Cs -Quelle (Gammotron S, Siemens) mit einer Gesamtdosis von 5 Gy (1,5 Gy/min) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden sofort 10 μ M BrdU (Sigma) in das Medium gegeben. Die Zellen wurden sofort danach bzw. nach 12, 24 und 30 h geerntet und der Anteil der Zellen in der S-Phase wie in Kapitel 2.5.1 „Durchflusszytometrie“ beschrieben bestimmt.

2.5.6 MTT-Assay

Für einen MTT-Assay wurden die MEF in der angegebenen Dichte in eine 96-Well-Kulturplatte gesät. An den darauf folgenden Tagen wurde täglich jeweils das Medium einer Platte gewechselt und 100 µl frisches Medium und 10 µl MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl-2H-tetrazoliumbromid, Promega) pro Well gegeben und für 3 h in dem Zellkulturinkubator weiter inkubiert. Mit 100 µl Stopplösung (1 g SDS in 9,9 ml DMSO gelöst, 600 µl Eisessig) wurde die Reaktion beendet. Nach einer 30 min Inkubation bei 37°C war das Reaktionspräzipitat gelöst, und die Extinktion konnte bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (Dynatech MR5000, Long Island Scientific, New York) gemessen werden.

2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden unter Anleitung von Frau Dr. Kuchler von Institut für Medizinische Biometrie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Student's t-Test wurde mit dem Computerprogramm Microsoft Excel (Microsoft), alle anderen Auswertungen mit dem Programm SPSS Version 11.0 (SPSS, Chicago) vorgenommen.

2.7 Oligonukleotide und Plasmide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

| Bezeichnung | Verwendung | Sequenz 5' → 3' ^a |
|-------------|---|--|
| MT-5'ko | Amplifizierung kurzer Arm <i>Targeting</i> -Vektor, <i>sense</i> | TGGCTTGCGATTGGGTGTTAATG |
| MT-3'ko | Amplifizierung kurzer Arm <i>Targeting</i> -Vektor, <i>antisense</i> | GCGATATCGAATTCAGGGC |
| MP-54 | 2-Primer PCR Genotypisierung, <i>sense</i> , siehe Abb. 6 | CCGGTTTGATGTGTCACTGG |
| MP-55 | 2-Primer PCR Genotypisierung, <i>antisense</i> , siehe Abb. 6 | TGCTCCTCCCCATTAACACC |
| MP-40 | 3-Primer PCR Genotypisierung, <i>sense</i> , siehe Abb. 6 | GCCTTCTATCGCCTTCTTGACG |
| MP-67 | 3-Primer PCR Genotypisierung, <i>sense</i> , siehe Abb. 6 | GACATGATTCTCACAGAGTAGC |
| MP-56 | 3-Primer PCR Genotypisierung, <i>antisense</i> , siehe Abb. 6 | ACAAACACAGGGTCAGCAGC |
| RTcdc25-s | RT-PCR <i>cdc25a</i> , <i>sense</i> | ACGGGGAAGATGCTGTTTGG |
| RTcdc25-as | RT-PCR <i>cdc25a</i> , <i>antisense</i> | CTGGTCGATGAGGTGAAAGG |
| RTTk-s | RT-PCR Thymidinsynthetase, <i>sense</i> | CACGGACTCTCGGTGCTAAC |
| RTTk-as | RT-PCR Thymidinsynthetase, <i>antisense</i> | CTATAGCGCGTGTCTTTGGC |
| RTE2F-s | RT-PCR E2F-1, <i>sense</i> | CATGGTGGGGATTGGTAAGC |
| RTE2F-as | RT-PCR E2F-1, <i>antisense</i> | GGTCTTCCCAGGGCTAATCC |
| RTmyc-s | RT-PCR c-myc, <i>sense</i> | GCCCTATTTCACTGCGACG |
| RTmyc-as | RT-PCR c-myc, <i>antisense</i> | GGTCTCGTCGTGAGATCGC |
| RTcdc6-s | RT-PCR <i>cdc6</i> , <i>sense</i> | GCTCTTTGCTGCTTTTGACC |
| RTcdc6-as | RT-PCR <i>cdc6</i> , <i>antisense</i> | ATTCTGGGGGCTCTCAAATG |
| RTAktin-s | RT-PCR β -Aktin, <i>sense</i> | CTTTGCAGCTCCTTCGTTGC |
| RTAktin-as | RT-PCR β -Aktin, <i>antisense</i> | GATCTTCTCCATGTCGTCCC |
| MP-70 | Gelretardationsexperiment, <i>TUBA7</i> -Promotor, Wt, <i>sense</i> | CCCCTCCAGCCACTCCAGAGCCTTCCCGCC AAATTTACATCCAATCAGAAAGTACCACCGC TTCAA |
| MP-71 | Gelretardationsexp., <i>TUBA7</i> -Promotor, Wt, <i>antisense</i> | TTGAAGCGGTGGTACTTTCTGATTGGATGTA AATTTGGCGGGAAGGCTCTGGAGTGGCTGG AGGGG |
| MP-72 | Gelretardationsexp., <i>TUBA7</i> -Promotor, E2Fmut, <i>sense</i> | CCCCTCCAGCCACTCCAGAGCCTTCTTAAC AAATTTACATCCAATCAGAAAGTACCACCGC TTCAA |
| MP-73 | Gelretardationsexp., <i>TUBA7</i> -Promotor, E2Fmut, <i>antisense</i> | TTGAAGCGGTGGTACTTTCTGATTGGATGTA AATTTGTTAAGAAGGCTCTGGAGTGGCTGG AGGGG |
| MP-96 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 | GATCTAAGTAAGCTTTGGAGGCC |
| MP-95 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 | GGAATGCCAAGCTTGCTGAAGTCCG |
| MP-91 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 (E2Fmut) | GCCACTCCAGAGCCTTCTTAAGAAAGCCAC ATCC |
| MP-97 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 (E2Fmut) | GGATGTGGCTTTCTTAAGAAGGCTCTGGAG TGGC |
| MP-98 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 (delE2F) | CCAGCCACTCCAGAGCCGCCACATCCAATC AG |
| MP-102 | Mutagenese <i>TUBA3</i> -Promotor, siehe Abb. 4 (delE2F) | CTGATTGGATGTGGCGGCTCTGGAGTGGCT GG |

^a: Substituierte Nukleotide sind unterstrichen.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

| Bezeichnung | Beschreibung und Klonierung |
|------------------------|--|
| pTV-Flox-EMA | <i>Targeting</i> -Vektor, siehe Kapitel 3.1.1 |
| pCR4Topo-In4-1292 | zur Generierung der 3'-Sonde für <i>Southern</i> -Hybridisierung, 1292 nt-langes PCR-Produkt des Introns 4 des <i>EMA/E2F-6</i> -Gens kloniert in den pCR4-Topo-Vektor (Invitrogen) |
| pUC19-In1-790 | zur Generierung der 5'-Sonde für <i>Southern</i> -Hybridisierung, 790 nt-langes PCR-Produkt des Introns 1 des <i>EMA/E2F-6</i> -Gens kloniert in den Hinc II- und den BamH I-Ort des pUC19-Vektors |
| pGEM7-5'UTRmEMA423bp | zur Generierung der 5'- <i>RPA</i> -Sonde für <i>EMA/E2F-6</i> , EcoR I/Bgl II-Fragment aus der 5'-Bereich der <i>EMA/E2F-6</i> -mRNA, kloniert in EcoR I- und den BamH I-Ort des pGEM7Zf(+)-Vektors (Promega), in <i>antisense</i> -Orientierung zum Sp6-Promotor, Linearisierung mit Xho I |
| pGEM7-mbeta-actin | zur internen Kontrolle eines <i>RPA</i> , 269 nt-langes PCR-Produkt der β -Aktin-mRNA kloniert in EcoR I-Ort des pGEM7Zf(+)-Vektors (Promega), in <i>antisense</i> -Orientierung zum Sp6-Promotor, Linearisierung mit Xba I |
| pCMV-hDP-1 | eukaryotischer Expressionsvektor für menschliches DP-1 (Helin, et al., 1993) |
| pCneo-3HA-hEMA | eukaryotischer Expressionsvektor für menschliches Hämagglutinin-gekoppeltes <i>EMA/E2F-6</i> (Sedlarz, 2004) |
| pRcCMV-hE2F-4 | eukaryotischer Expressionsvektor für menschliches E2F-4 (von R. Bernards, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) |
| pGL3-Basic | Luciferase-Reportervektor (Promega) |
| pGL3Basic-TUBA3 | 679 bp oberhalb des Translationsstartes des <i>TUBA3</i> -Gens als Hind III-behandeltes PCR-Fragment in den Hind III-Ort des pGL3-Basic-Vektors kloniert |
| pGL3Basic-TUBA3-E2Fmut | Promotormutante von pGL3Basic-TUBA3, rekombinante Mutagenese des potentiellen E2F-Elements des <i>TUBA3</i> -Promotorbereichs: TTCCCGCCAAA \Rightarrow TTCTTAAGAAA, siehe Kapitel 2.4.7 |
| pGL3Basic-TUBA3-delE2F | Promotormutante von pGL3Basic-TUBA3, Deletion des potentiellen E2F-Elements im <i>TUBA3</i> -Promotorbereich mittels rekombinanter Mutagenese, siehe Kapitel 2.4.7 |
| pUC19 | kleiner Plasmid-Klonierungsvektor, benutzt, um eine DNA-Sollmenge bei Transfektionen zu erzielen |
| RSV- β -Gal | β -Galactosidase-Reportervektor unter der Kontrolle des Promotors des Rous Sarkoma Virus (von G. Suske, IMT Marburg), interne Kontrolle zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen |
| pDsRed2-N1 | eukaryotischer Expressionsvektor für eine Variante des rot fluoreszierenden Proteins EdRed aus der Koralle <i>Discosoma</i> (BectonDickinson Clontech), benutzt zur allgemeinen Kontrolle der Transfektionseffizienz |

3 Ergebnisse

3.1 Inaktivierung des *EMA/E2F-6*-Gens der Maus

3.1.1 Klonierung des *Targeting*-Vektors und Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone

Das *EMA/E2F-6*-Gen sollte durch Mutation mittels homologer Rekombination in ES-Zellen inaktiviert werden. Für die homologe Rekombination mußte ein entsprechender *Targeting*-Vektor kloniert werden. Der parentale Vektor pTV-Flox wurde von Frau Prof. Birchmeier-Kohler (MDC Berlin) zur Verfügung gestellt. Er enthält eine Transkriptionseinheit der Neomycinphosphotransferase (*neo*), die Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin vermittelt und deshalb als selektierbarer Marker verwendet werden kann. Die Transkriptionseinheit ist beidseitig flankiert von multiplen Klonierungsorten, in die jeweils ein Abschnitt des *EMA/E2F-6*-Gens kloniert wurde. Der Vektor ist ein *Replacement*-Vektor, der den Austausch eines definierten Abschnitts des Gens mit der *neo*-Kassette des Vektors vermittelt. Ein effizienter *Targeting*-Vektor sollte möglichst lange homologe Bereiche zu dem betreffenden Gen enthalten. Es hat sich außerdem gezeigt, dass ein asymmetrischer Vektor mit einem sogenannten langen und einem kurzen Arm, d. h. unterschiedlich lange Sequenzabschnitte des Gens beiderseits der *neo*-Kassette, die Häufigkeit der homologen Rekombination steigert. In den 5'-Klonierungsort von pTV-Flox wurde ein ca. 7,5 kb langes Restriktionsfragment kloniert. Dazu wurde ein PAC-Plasmid (genomische PAC-Bibliothek RPCI21 des Mausstamms 129/Sv, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo), das das *EMA/E2F-6*-Gen enthält, einer Restriktionsreaktion mit den Endonukleasen Sma I und Bst1107 I unterzogen (Abb. 6). Die Erkennungssequenz für Bst1107 I befindet sich im Anfangsbereich des Exons 4. Demzufolge würde die 3'-Spleißstelle des Introns 3 im rekombinanten Gen erhalten bleiben, und unerwünschte Spleißereignisse (*exon hopping*), die zur Eliminierung der *neo*-Kassette führen könnten, können somit vorgebeugt werden. Das gewünschte Restriktionsfragment wurde in Vorversuchen mittels Southern-Hybridisierung identifiziert (Daten nicht gezeigt). An beide Enden des isolierten Restriktionsfragments wurden 12 bp-lange Doppelstrang-Oligonukleotide mit der Erkennungssequenz für die Endonuklease Not I (*Not I-Linker*, New England Biolabs) für die Klonierung in den Vektor ligiert und damit ungerichtet in den 5'-Klonierungsort von pTV-Flox kloniert. Der kurze Vektorarm, 3' von der *neo*-Kassette, ist ein 1347 bp langes PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden MT-5'ko und MT-3'ko generiert worden ist. Das Produkt wurde ungerichtet in den Pmi I-Restriktionsort des Vektors kloniert. Da Linearisierung des Vektors die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination wesentlich erhöht (Thomas, et al., 1986), wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym Asc I linearisiert, dessen einmalige Erkennungssequenz sich im Vektor unmittelbar 3' nach dem kurzen Arm befindet. Die Beschaffenheit des *Targeting*-Vektors pTV-Flox-EMA sollte das *EMA/E2F-6*-Gen nach homologer Rekombination so mutieren, dass es ab dem Restriktionsort der Endonuklease Bst1107 I im Exon 4 unterbrochen ist. Der 3' nachfolgende Bereich ist bis ca. zur Mitte des Introns 4 entfernt und stattdessen befindet sich die *neo*-Kassette (Abb. 6). Mit dieser Fremdsequenz wurde außerdem ein Translations-Terminationskodon in jeden Leserahmen der *EMA/E2F-6*-Sequenz eingefügt. Zusätzlich sollte die Unterbrechung der Struktur des *EMA/E2F-6*-Gens zur Instabilität der rekombinanten RNA führen. Falls die RNA nicht vollständig abgebaut und zusätzlich das Translationsterminations-Signal überlesen worden wäre, würde zumindest die wichtige DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors EMA/E2F-6, die von Exon 4 kodiert wird, in dem Translationsprodukt fehlen. Zusätzlich würde der sich anschließende C-terminale Teil des Gens nicht mehr im *EMA/E2F-6*-Leserahmen sein.

Die ES-Zellkultur und die Generierung der chimären Mäuse wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Birchmeier-Kohler mit der Unterstützung von Frau Rudolf und Herrn Dr. Strehle durchgeführt. Der Vektor wurde mittels Elektroporation in ES-Zellen des Klons E14-1 aus dem Mausstamm 129/Ola transfiziert (Kühn, et al., 1991), damit die zelluläre Rekombinationsmaschinerie die genomischen Vektoranteile einschließlich der *neo*-Kassette während der Mitose in eine Kopie des *EMA/E2F-6*-Gens einfügt. Da Rekombinationsereignisse selten sind, mußte auf rekombinante ES-Zellen selektioniert werden. Rekombinante ES-Zellen exprimierten den positiven Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase. Deshalb wurde dem Kulturmedium der Selektionsmetabolit G418 (Geneticin) zugegeben. Die überlebenden Zellen expandierten zu Kolonien, die isoliert wurden und auf das beabsichtigte Rekombinationsereignis per Southern-Hybridisierung getestet wurden (Abb. 6).

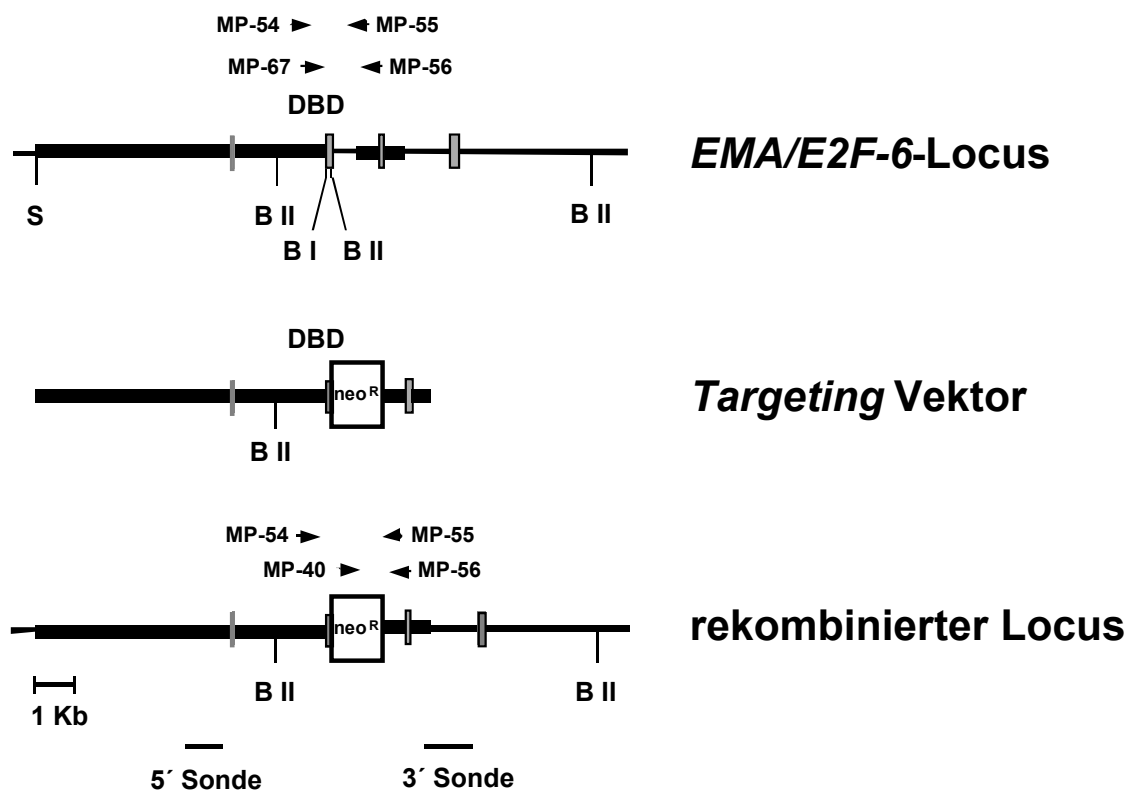


Abb. 6: Das *EMA/E2F-6*-Gen der Maus wurde durch homologe Rekombination inaktiviert. Abgebildet sind ein Teil des Wildtyp-*EMA/E2F-6*-Locus, der Targeting Vektor und der *EMA/E2F-6*-Locus nach der homologen Rekombination. Exon 3 bis 6 sind als graue Boxen dargestellt. Exon 4 kodiert die DNA-Bindungsdomäne (DBD); sie wurde zum großen Teil infolge der homologen Rekombination durch die Neomycin-Resistenzkassette (*neo*^R) ersetzt. Der 5'-Arm des Targeting Vektors war ein 7,5 kb langes Sma I/Bst1107 I-Restriktionsfragment. Der kürzere 3'-Arm wurde mittels PCR generiert. Beide Sequenzabschnitte sind im Wildtyp- und im rekombinierten Gen als breite Linien schematisiert. Eine erfolgreiche Rekombination in ES-Zellen wurde mittels Southern-Hybridisierung unter Verwendung der 3'-Sonde bestimmt. Positive Zellklone wurden durch Hybridisierung mit der 5'-Sonde verifiziert. Der Genotyp der Mäuse wurde allerdings mittels zweier eigenständiger PCR bestimmt: Für die Dreiprimer-PCR wurden die Oligonukleotide MP-40, MP-67 und MP-56 und für die Zweiprimer-PCR die Oligonukleotide MP-54 und MP-55 eingesetzt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind wie folgt abgekürzt: S, Sma I; BI, Bst1107 I; BII, Bgl II.

Zur Identifizierung der positiven ES-Zellklone wurde die 3'-Sonde verwendet. Sie ist homolog zu einem Bereich des *EMA/E2F-6*-Gens, der sich außerhalb der Zielsequenz des Targeting-Vektors befindet. Damit wurde

verhindert, dass auch Abschnitte des Genoms getestet wurden, in die der Vektor unspezifisch (nicht homolog) integriert wurde. Für diese Hybridisierung wurde die ES-Zell-DNA mit der Endonuklease Bgl II behandelt. Die Sonde hybridisierte mit einem Bgl II-Fragment, das im Exon 4 – 3' von der für die Rekombination relevanten Bst1107 I-Erkennungsstelle – begann und bis in das Intron 6 hineinreichte (Abb. 6). Restriktionsfragmente des Wildtyp-Locus hatten wie erwartet eine Größe von ca. 6,5 kb (Abb. 7 A). Da im rekombinierten Locus die Erkennungsstelle für Bgl II im Exon 4 fehlte, war in *EMA/E2F-6*-mutierten Mäusen das von der 3'-Sonde detektierte Fragment größer. Von 311 Neomycin-resistenten Klonen erzeugten fünf das für einen heterozygoten Genotyp erwartete Bandenmuster im Autoradiogramm. Das ergibt eine Effizienz der homologen Rekombination von 1,6 % und liegt damit etwas höher als die durchschnittliche Effizienz von weniger als 1 %.

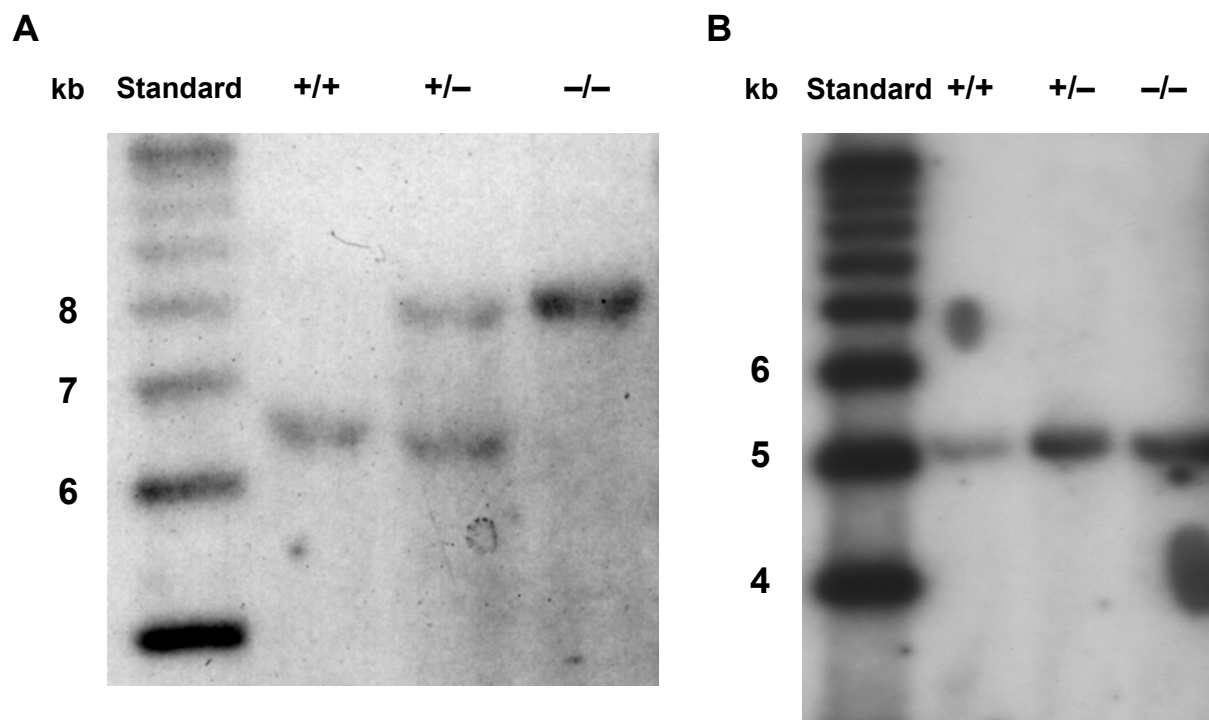


Abb. 7: **Überprüfung der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels Southern-Hybridisierung.** Beispielhaft ist die DNA des Klons B6 gezeigt. (A) Autoradiogramm einer Hybridisierung mit der 3'-Sonde (siehe Abb. 6). Die genomische DNA aus Gewebe von Wildtyp- (+/+), *EMA/E2F-6*-heterozygoten (+/-) und -homozygoten Mäusen (-/-) wurde mit der Restriktionsendonuklease Bgl II behandelt und die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Das Einfügen der Neomycin-Resistenzkassette durch die Rekombination deletierte einen Erkennungsort für die Endonuklease Bgl II. Daraus resultierte ein größeres Bgl II-Restriktionsfragment des rekombinierten *EMA/E2F-6*-Locus, an das die Sonde hybridisierte. Da die Sonde komplementär zu einer Sequenz außerhalb des *Targeting* Vektors war, konnte gleichzeitig der korrekte Rekombinationsort im Genom bestimmt werden. (B) Autoradiogramm einer Hybridisierung mit der 5'-Sonde (siehe Abb. 6). Diese Hybridisierung diente dem Ausschluß von fehlerhaften Rekombinationsereignissen, bei denen der lange Arm des *Targeting* Vektors nicht mit dem homologen Bereich des Genlocus ausgetauscht wurde, sondern in 3'-Richtung dahinter inseriert worden ist. In diesem Fall würde die Sonde ein längeres DNA-Fragment nach Behandlung mit der Restriktionsendonuklease Hpa I detektieren.

Die fünf positiv getesteten Klone wurden zusätzlich mittels einer zweiten Southern-Hybridisierung auf Korrektheit im 5'-Bereich unmittelbar vor dem Rekombinationsort untersucht. Die 5'-Sonde hybridisierte an einem Abschnitt des *EMA/E2F-6*-Gens, der dem langen Arm des *Targeting*-Vektors entspricht (Abb. 6). Mit dieser Hybridisierung konnte überprüft werden, ob die Vektorabschnitte wie geplant integriert worden sind. Es

kann vorkommen, dass der Vektor hinter der zum langen Arm komplementären Sequenz inseriert wurde. Die Folge wären zwei identische Sequenzabschnitte hintereinander, die die Sequenzinformation des langen Arm trügen. Um diese Konstellation testen zu können, wurde die ES-Zell-DNA mit der Endonuklease Hpa I behandelt. Vom Wildtyp-Locus wie vom korrekt rekombinanten Locus sollten ein Fragment von ca. 5 kb detektiert werden. Alle fünf Klone erzeugten dieses Bandenmuster (Abb. 7 B und Daten nicht gezeigt).

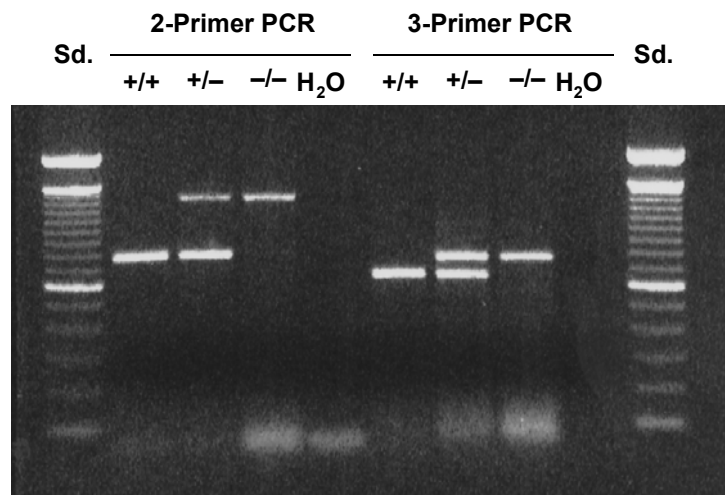


Abb. 8: **Bestimmung des Genotyps der Mäuse mittels PCR.** Der Genotyp der Mäuse wurde jeweils mit zwei PCR ermittelt. Die beiden Oligonukleotide der 2-Primer-PCR sind komplementär zu *EMA/E2F-6*-Gensequenzen unmittelbar 5' bzw. 3' des Bereichs, der durch die Neomycinresistenz-Kassette während der homologen Rekombination ersetzt wurde. Da die insertierte Kassette größer war als der entsprechende Bereich des *EMA/E2F-6*-Gens, wurde ein größeres Fragment vom rekombinierten Locus amplifiziert. Für die 3-Primer PCR wurde ein für die Wildtypsequenz sowie ein für die Neomycinkassette spezifisches Oligonukleotid in Kombination mit einem gemeinsamen Gegenstrang-Oligonukleotid verwendet. Das PCR-Produkt vom rekombinierten Locus war ebenfalls größer. Für diese Abbildung wurde zur Demonstration genomische DNA von Wildtyp- (+/+), *EMA/E2F-6*^{+/-} (+/-) und *EMA/E2F-6*^{-/-}-Mäusen (-/-) als PCR-Matritze eingesetzt. Die Reinheit der Reaktion wurde kontrolliert, indem H₂O anstatt DNA eingesetzt wurde. Mit Sd. ist der 100bp-Größenstandard abgekürzt.

Beide Southern-Hybridisierungen hatten ergeben, dass fünf rekombinante ES-Zellklone für die Generierung *EMA/E2F-6*-defizienter Mäuse zur Verfügung standen. Mit der nachfolgenden Sequenzierung des Integrationsabschnitts der *neo*-Kassette im Genom eines Klons wurde sicher gestellt, dass in den Translationsleserahmen des *EMA/E2F-6*-Gens ein Terminationsskodon eingefügt wurde (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Generierung *EMA/E2F-6*-defizienter Mäuse

Da das Genom der ES-Zellklone nicht lückenlos auf parallele unerwünschte Rekombinationsereignisse getestet werden kann, mussten, um den Phänotyp der *EMA/E2F-6*^{-/-}-Mäuse ausschließlich auf die Inaktivierung des *EMA/E2F-6*-Gens zurückführen zu können, mindestens zwei voneinander unabhängige Mauslinien etabliert werden. Da es außerdem Unterschiede in der Keimbahngängigkeit der ES-Zellklone geben kann, wurden drei ES-Zellklone separat in Blastozysten injiziert. Von jedem der ES-Zellklone konnten hochchimäre Mäuse generiert werden, die die Mutation an ihre Nachkommen weitergegeben haben (Daten nicht gezeigt). Die Mauslinien wurden parallel analysiert, und es wurden keine Unterschiede festgestellt. Die Ausprägung und die Penetranz

eines Phänotyps kann entscheidend vom Mausstammhintergrund abhängen (Classon and Dyson, 2001; Cloud, et al., 2002; Harvey, et al., 1993; Pearson, 2002). Daher wurden die chimären Mäuse mit Partnern sowohl des 129/Ola-Stammes verpaart, um Mäuse mit einem reinen 129/Ola-Stammhintergrund zu erhalten als auch mit Partnern des C57BL/6-Stammes, um Nachkommen mit einem gemischten Stammhintergrund zu erhalten.

Der Genotyp der Mäuse wurde mittels zweier unabhängiger PCR ermittelt (Abb. 8). Bei der 2-Primer-PCR wurde der Größenunterschied zwischen der genomischen Sequenz und der eingefügten neo-Kassette zur Unterscheidung von Wildtyp- (776 bp) und rekombinantem Allel (1319 bp) ausgenutzt (Abb. 6). In der 3-Primer-PCR wurden dagegen spezifische Gegenstrang-Oligonukleotide für die Synthese jeweils eines spezifischen Produktes vom Wildtyp-Allel (660 bp) und vom rekombinanten Allel (762 bp) eingesetzt (Abb. 6).

Die Expression des mutierten *EMA/E2F-6*-Gens in den Mäusen wurde zunächst auf RNA-Ebene mittels eines *RNase Protection Assays* (RPA) kontrolliert (Abb. 9). Die RNA-Sonde war komplementär zum 5'-Bereich der *EMA/E2F-6*-mRNA. Sie wurde so konstruiert, dass, falls die rekombinierte *EMA/E2F-6*-mRNA exprimiert würde, zwischen Wildtyp- und rekombinantem Transkript anhand ihrer Größendifferenz unterschieden werden konnte, da der komplementäre Abschnitt der Sonde im Exon 4 in 3'-Richtung ca. 40 Nukleotide nach der für die Rekombination benutzten Bst1107 I-Erkennungssequenz endete. Die Abbildung 9 zeigt, dass ein verkürztes Transkript mit einer geringen Expressionshöhe in hetero- und homozygoten Mäusen detektiert worden ist (ungefüllte Pfeilspitze) und weist damit auf eine niedrige Expression der rekombinierten RNA hin.

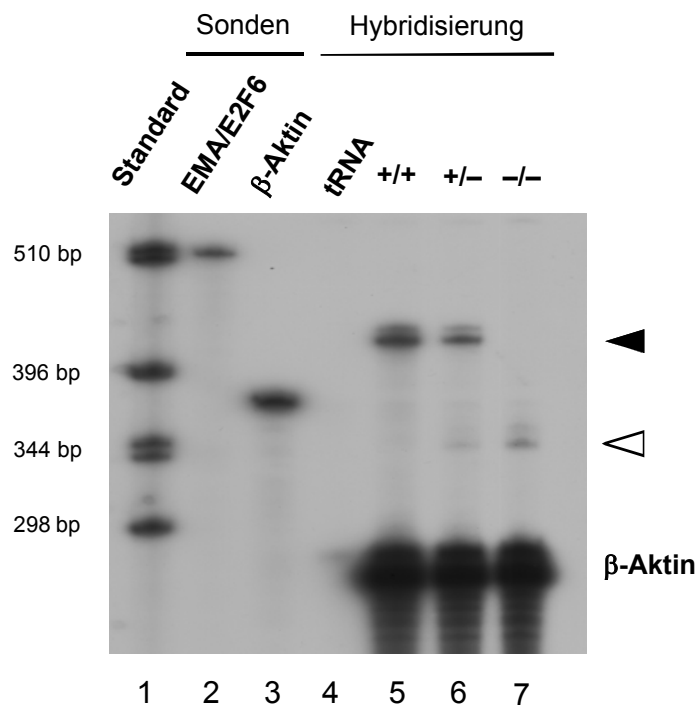


Abb. 9: **Bestimmung der *EMA/E2F-6*-Expression in Mäusen mit mutiertem *EMA/E2F-6*-Gen mittels *RNase Protection Assay*.** Die RNA-Sonde war komplementär zum 5'-Bereich der *EMA/E2F-6* mRNA. Sie schloss den 5'-nichtkodierenden Bereich ein und reichte in das Exon 4 hinein. In den Spuren 2 und 3 sind die unbehandelten Sonden aufgetragen. β -Aktin diente als interne Kontrolle. Beide Sonden wurden mit Gesamt-RNA aus dem Muskel von Wildtyp- (+/+), *EMA/E2F-6*^{+/-} (+/-) und *EMA/E2F-6*^{-/-} (-/-) Mäusen (-/-) sowie mit tRNA aus Hefe als Spezifikationskontrolle inkubiert. Die gefüllte Pfeilspitze zeigt auf das geschützte *EMA/E2F-6*-Fragment mit der erwarteten vollen Länge. Die ungefüllte Pfeilspitze weist auf ein Fragment hin, dessen Größe der eines Transkripts entspricht, das vom rekombinanten Allel exprimiert werden würde.

Wir gehen heute davon aus, dass die physiologisch wirksame Aktivität von EMA/E2F-6 allein durch das Protein bereitgestellt wird. Frau Prof. Lees (MIT, Boston) hat generös Antikörper zur Verfügung gestellt, mit denen sich das endogene Mausprotein nachweisen läßt. Es wurden zwei monoklonale EMA/E2F-6-Antikörper eingesetzt, die Epitope in verschiedenen Regionen erkennen, um auch verkürzte EMA/E2F-6-Formen detektieren zu können (Trimarchi, et al., 1998). Beide Immunoblots zeigen klar den Verlust eines prominenten Signals bei einer erwarteten Proteingröße von ca. 37 kDa in aufgetrennten Extrakten aus EMA/E2F-6^{-/-}-Primärzellen und -Geweben (Abb. 10). Ein verkürztes EMA/E2F-6-Protein wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

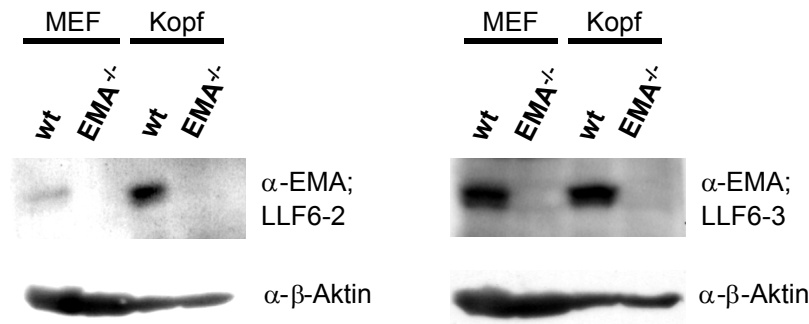


Abb. 10: **EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse exprimieren kein EMA/E2F-6-Protein.** Mittels Immunoblot wurden embryonale Fibroblasten (MEF) und der embryonale Kopf auf EMA/E2F-6-Expression untersucht. Dafür wurden zwei EMA/E2F-6-spezifische Antikörper, die verschiedene Epitope erkennen, eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente die Expressionsanalyse von β-Aktin auf derselben Membran.

3.2 Charakterisierung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse

EMA/E2F-6^{+/-}- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse beider Stammhintergründe wurden – mit einer Einschränkung – der Mendelschen Vererbungsregel folgend geboren (Tabelle 4). In der F₂-Generation des C57BL/6x129/Ola-Stammes waren die heterozygoten und die homozygoten Mäuse jeweils um die Hälfte reduziert. In den folgenden Generationen dagegen traten die Nachkommen mit dem erwarteten Verhältnis auf. Es fehlten in der F₂-Generation sowohl Weibchen als auch Männchen zu gleichen Teilen (Daten nicht gezeigt). Um der Ursache des Verlustes der Mäuse nachzugehen, wurden die heterozygoten Mäuse der F₁-Generation (die direkten Nachkommen der Chimären) beider Geschlechts mit einem C57BL/6-Wildtyppartner verpaart. Allerdings wurden gleich viele heterozygote und Wildtyp-Mäuse geboren, wie es für den Fall, dass EMA/E2F-6 keine limitierende Funktion in der Embryonalentwicklung hat, zu erwarten war (Daten nicht gezeigt). Die Frage nach der Ursache der Reduktion wurde dann nicht weiter verfolgt.

Junge EMA/E2F-6^{+/-}- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse waren ohne offensichtliche Beeinträchtigungen. Das Gewicht der inneren Organe in Relation zum Körpergewicht war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht verändert. Die inneren Organe wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Krenn (Institut für Pathologie der Charité) histologisch untersucht. Es wurden keine Fehlentwicklungen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Mäuse waren fruchtbar und im Gegensatz zu einer veröffentlichten Studie waren die Hoden und Nebenhoden unserer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse ebenfalls unverändert (Storre, et al., 2002). Die Autoren haben eine verminderte Anzahl reifer Spermatozyten und vermehrt Leydig-Zellen im Hoden sowie einen unvollständigen Füllzustand des Nebenhodens mit Spermatozyten beschrieben. Aufgrund dieser Studie wurden zusätzlich die Hoden und Neben-

hoden von je fünf Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-Männchen untersucht, die exakt das Alter der Tiere wie in der Veröffentlichung hatten. Das Ergebnis bestätigte unsere erste Untersuchung (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen beiden Analysen werden später diskutiert.

Tabelle 4: Nachkommen aus den Verpaarungen heterozygoter Mäuse.

| | | WT | EMA ^{+/-} | EMA ^{-/-} | P ^a |
|---|-------------------------|-----|--------------------|--------------------|----------------|
| Erwartetes Verhältnis | | 1 | 2 | 1 | |
| <u>Stamm C57BL/5x129/Ola:</u> | | | | | |
| Gesamtpopulation | Anzahl Nachkommen | 107 | 183 | 108 | 0,512 |
| | Beobachtetes Verhältnis | 1,0 | 1,7 | 1,0 | |
| F ₂ -Generation | Anzahl Nachkommen | 56 | 56 | 36 | 0,02 |
| | Beobachtetes Verhältnis | 1,0 | 1,0 | 0,7 | |
| F ₃ -Generation und folgende | Anzahl Nachkommen | 51 | 127 | 72 | 0,434 |
| | Beobachtetes Verhältnis | 1,0 | 2,5 | 1,4 | |
| <u>Stamm 129/Ola:</u> | | | | | |
| Gesamtpopulation | Anzahl Nachkommen | 69 | 130 | 48 | 0,3 |
| | Beobachtetes Verhältnis | 1,0 | 1,9 | 0,7 | |

^a: Signifikanzschranke nach Chi-Quadratstest

Neben der Bewertung der augenscheinlichen Fitness und der Untersuchung der Organe liefert auch das Körpergewicht eine Einschätzung über den allgemeinen Gesundheitszustand und die postnatale Entwicklung. Das Gewicht der Mäuse wurde während der ersten 30 Lebenswochen im zweiwöchigen Rhythmus bestimmt. Die Abbildung 11 zeigt, dass Wildtyp-, EMA/E2F-6^{+/-}- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse mit einem Lebensalter von zwei Wochen gleich schwer waren und in gleichem Maß an Gewicht zunahmen. Auch bei sporadischen Messungen zu späteren als den abgebildeten Zeitpunkten unterschieden sich die Mäusegruppen nicht voneinander (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 12 stellt dar, dass EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse ebenso lange wie ihre Wildtyp-Geschwister lebten. Mäuse, die anhand der Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* körperlich litten, wurden getötet und zusammen mit den gestorbenen Mäusen auf die Krankheits- bzw. Todesursache untersucht. Es wurde eine Reihe von makroskopischen Veränderungen wie beispielsweise fehlende Schneidezähne, Eierstockzysten, Splenomegalie und Tumore in der Speicheldrüse und in der Lunge mit gleicher Häufigkeit und bei gleichem Alter der EMA/E2F-6^{-/-}-und Kontroll-Mäuse festgestellt (Daten nicht gezeigt). Lebertumore, Tumore im Afterbereich und in der Niere sowie eine vergrößerte Bläschendrüse, die einen ödematösen Tumor darstellt, waren in EMA/E2F-6-defizienten Mäusen dagegen seltener zu finden. Bei EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen traten zudem die Nierentumore später als bei Wildtyp-Mäusen auf (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde können Hinweise dafür sein, dass das Fehlen von EMA/E2F-6 eine Hemmung unkontrollierten Gewebewachstums zur Folge hat. Daher wurden diese Tumore einer histopathologischen Analyse unterzogen (mit Kontrolle durch Herrn Prof. Krenn): 42 % der Tumore aus Wildtyp-Mäusen und 27 % der Tumore aus EMA/E2F-6-defizienten Mäuse waren maligne (Tabelle 5). Da der Unterschied statistisch nicht signifikant ist (Log Rank

Test: $P=0,8$), deuten die Daten an, dass der Verlust von EMA/E2F-6 keine Einfluss auf die Entwicklung von malignen Tumoren hatte.

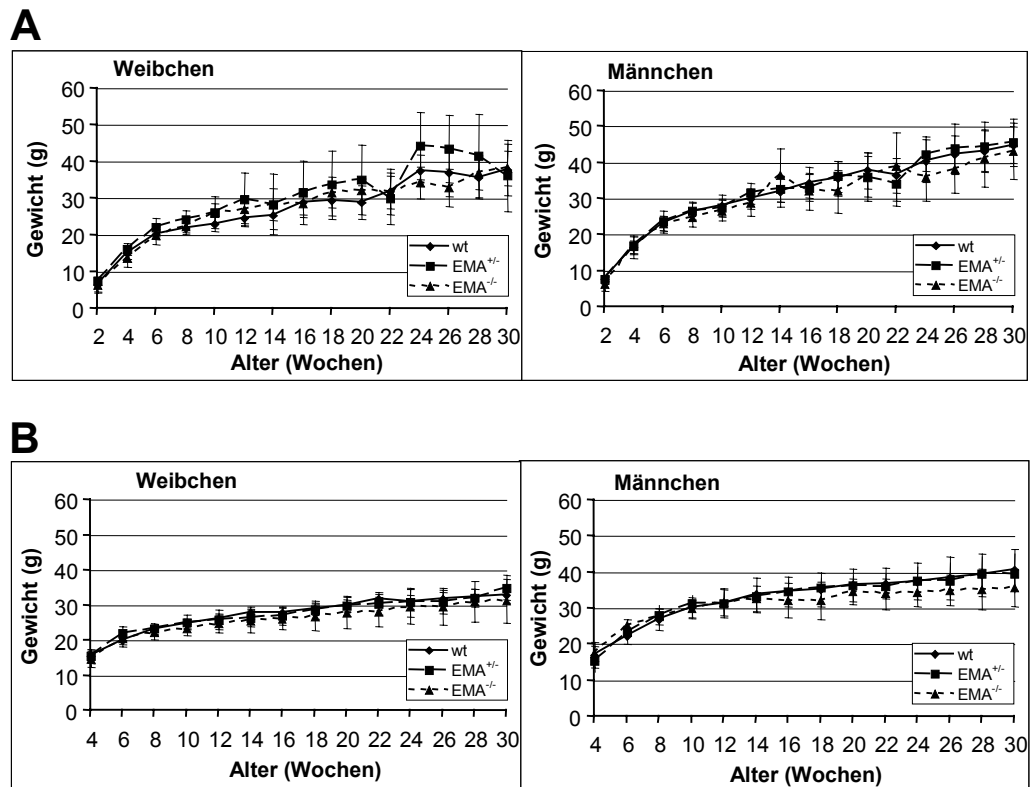


Abb. 11: **Das Körpergewicht EMA/E2F-6-mutierter Mäuse ist gleich dem der Kontrollgruppe.** Von je zehn Wildtyp-, EMA/E2F-6^{+/+} und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen (A) mit einem gemischten C57BL/6x129Ola- und (B) einem reinen 129/Ola-Stammhintergrund wurde das Körpergewicht innerhalb der ersten 30 Lebenswochen bestimmt.

E2F-1, E2F-3 und E2F-4 regulieren die Differenzierung der Adipozyten (Fajas, et al., 2002). Unter fettreichem Futter nehmen Wildtyp-Mäuse innerhalb kurzer Zeit an Gewicht zu; E2F-1^{-/-}-Mäuse dagegen nicht, da sie nur unterentwickelte Fettzellen besitzen. Ob EMA/E2F-6 auch an der Differenzierung von Adipozyten beteiligt ist, wurde analysiert, indem die Fähigkeit der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse zur Fettspeicherung untersucht wurde. Da Mäuse in der Käfighaltung nach dem Abschluss der Wachstumsphase Fettpolster anlegen, gab die Bestimmung des Körpergewichts bereits einen ersten Hinweis auf einen normalen Fetthaushalt und Energiestoffwechsel von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen. Mäuse beider Geschlechts wurden mehrere Wochen unter einer fettreichen Diät gehalten. Obwohl Wildtyp- und EMA/E2F-6-defiziente Mäuse mit fettreichem Futter deutlich an Gewicht zunahmen, wie der Vergleich mit einer Kontrollgruppe unter Haltungsfutter zeigte, unterschied sich das Ausmaß der Zunahme beider Tiergruppen nicht (Daten nicht gezeigt). Da sich auch das weiße und braune Fettgewebe EMA/E2F-6-defizienter Mäuse bei einer histologischen Analyse nicht von Kontrollgewebe unterschieden hatte (Daten nicht gezeigt), konnte zusammenfassend kein Hinweis auf eine Beteiligung von EMA/E2F-6 an der Adipozytendifferenzierung gefunden werden.

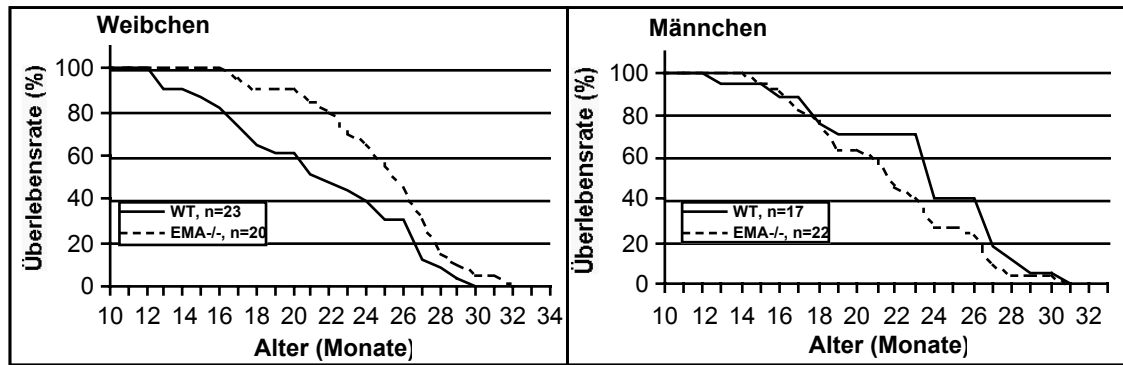


Abb. 12: **Die Lebenserwartung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse ist unverändert.** Die gewerteten Tiere sind entweder auf natürlichem Wege gestorben oder mussten aufgrund ihres schlechten Gesundheitszustandes getötet werden.

3.3 Der Verlust von EMA/E2F-6 führt zu einem primären axonalen Schaden

Ein Viertel der EMA/E2F-6-defizienten Mäuse des C57BL/6x129/Ola-Stammes entwickelte ab einem Alter von 18 Monaten (\bar{O} : 24 ± 3 Monate) eine starke Lähmung der Hinterbeine, eine schlaffe Paraparese (Abb. 13). Die Stärke der Symptome nahm innerhalb kurzer Zeit zu: Die Mäuse konnten sich dann auch nicht mit den Vorderpfoten an einem Gitter festhalten (Tetraparese). Später lagen sie auf der Seite und konnten nicht mehr laufen. EMA/E2F-6-mutierte 129/Ola-Mäuse zeigten ebenfalls diese Lähmungssymptome. Da hier nur wenige Mäuse zur Verfügung standen, kann keine Aussage gemacht werden, ob der genetische Hintergrund einen Einfluss auf Häufigkeit und Stärke der Lähmungen hatte. Die vorläufigen Daten deuten allerdings an, dass im 129/Ola-Hintergrund die Penetranz der Symptomatik nicht höher als in dem gemischten Hintergrund war. Bemerkenswert ist, dass auch EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse von der Lähmung betroffen waren. Es standen ebenfalls nur einige EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse zur Verfügung, aber es deutet sich an, dass bei EMA/E2F-6^{+/-}-Mäusen die Erkrankung weniger dramatisch war. Wegen der geringen Größe dieser Mausgruppe kann ebenfalls keine Angabe über die Penetranz der Symptome gemacht werden.

Tabelle 5: **Die Häufigkeit maligner Tumore ist in EMA/E2F-6^{-/-} und Wildtyp-Mäusen gleich.**

| Tumorarten | Anzahl der Tumore | |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| | Wildtyp (n=26) | EMA/E2F-6 ^{-/-} (n=34) |
| alle malignen Tumore ^a | 11 | 9 |
| primäre Lebertumore | 4 | 4 |
| Plasmozytome/Lymphome | 5 | 2 |
| Sarkome | 0 | 2 |
| andere | 3 | 1 |

^a: Log Rank Test: $P=0,8$

Da die Lähmung nur bei einem Viertel der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob mehr Mäuse erkrankt waren und bei ihnen Krankheitsanzeichen nur unter besonderen Bedingungen sichtbar werden können. Dieser Frage wurde mit einem Rota-Rod-Test nachgegangen. Er wurde bereits 1957 beschrieben und dient der Bewertung der sensorimotorischen Koordination, der Gleichgewichtskoordination und der motorischen Lernfähigkeit (Dunham and Miya, 1957). Dazu muß die Maus kontinuierlich auf einer sich drehenden und beschleunigenden Walze laufen (Abb. 3). Es wird die Dauer gemessen, mit der sich die Maus in

mehreren aufeinander folgenden Versuchen auf der Walze halten kann. EMA/E2F-6-defiziente Mäuse, die Lähmungssymptome zeigten, fielen bereits bei der Anfangsgeschwindigkeit von der Walze. Jeweils fünf Versuche wurden auch mit 12 und 24 Monate alten Wildtyp- und symptomfreien EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Die Messreihen von beiden Tiergruppen unterschieden sich allerdings nicht signifikant voneinander (Daten nicht gezeigt). Demzufolge waren die symptomfreien Mäuse nicht erkrankt oder ihre Erkrankung konnte mit einem Rota-Rod-Test nicht festgestellt werden.

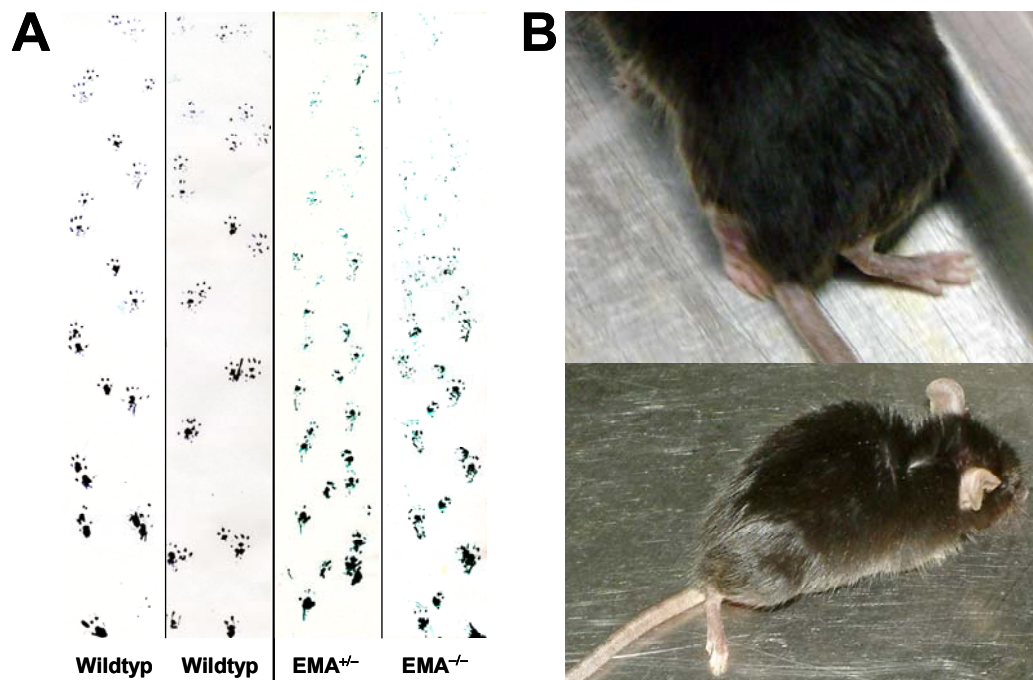


Abb. 13: **Adulte EMA/E2F-6^{+/-}-und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse leiden an einer Lähmung der Beine.** (A) Zwei symptomatischen (Genotypen sind angegeben) und zwei gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen wurden die Pfoten mit Tinte gefärbt und dann auf Papier gesetzt, um ihr Laufmuster aufzunehmen. (B) Zwei symptomatische Mäuse wurden während des Laufens fotografiert. Deutlich zu erkennen sind das Nachziehen der Hinterbeine und das Aufliegen des Rumpfes.

Es wurden insgesamt jeweils sechs Wildtyp- und gelähmte EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse sowie vier nichtsymptomatische EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse in Kooperation mit Herrn Dr. van Landeghem (Institut für Neuropathologie der Charité) histopathologisch und elektronenmikroskopisch analysiert, um die zelluläre Ursache der Lähmung aufzuklären. Bewegungseinschränkungen können unter anderem durch rheumatische Entzündungen der Gelenke verursacht werden. Die Gelenke mehrerer Mäuse wurden mittels Röntgenaufnahmen untersucht. Da hier keine Veränderungen festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt), wurde als Nächstes das Nervensystem histologisch untersucht. Über die gesamte Länge des Rückenmarks symptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse wurden in den Vorder-, Seiten- und Hinterseitensträngen, d. h. in den auf- und absteigenden Nervenbahnen, zum Teil großflächige Gewebsläsionen beobachtet. Diese Läsionen waren von eingewanderten Makrophagen begleitet, die regelrechte Einwanderungsfronten gebildet hatten (Abb. 14). Läsionen und Infiltrationen blieben überwiegend auf die weiße Substanz des Rückenmarks beschränkt. Es waren allerdings keine Lymphozyten zu finden, sodass es sich hier nicht um einen entzündlichen Prozess handelte. Die Makrophagen des Nervensystems gehören zu den Mikroglia, die mittels Tomatenlektin nachweisbar sind. Die Lektinfärbung von Rückenmarksschnitten bestätigte

das vermehrte Auftreten von Makrophagen (Abb. 15). Obwohl nichtsymptomatische EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse keine Läsionen hatten, konnte beobachtet werden, dass bei ihnen ebenfalls, wenn auch deutlich weniger, Makrophagen infiltriert waren (Abb. 15). Mit einer LFB/PAS-Färbung (Luxol fast blue, *Periodic acid shiff*; Glykogenfärbung) wurde außerdem im Rückenmark symptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse in hohem Maße und nichtsymptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse weniger stark ausgeprägt PAS-positives Myelin, d. h. prozessiertes und somit von Makrophagen aufgenommenes Myelin, als dunkelrosa gefärbte Makrophagen nachgewiesen (Abb. 16). Die Läsionen, die Einwanderungszone der Makrophagen und das PAS-positive Myelin waren zusammen lokalisiert. Eingewanderte Makrophagen einschließlich PAS-positivem Myelins wurden auch in Spinalnerven (Rückenmarksnerven) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

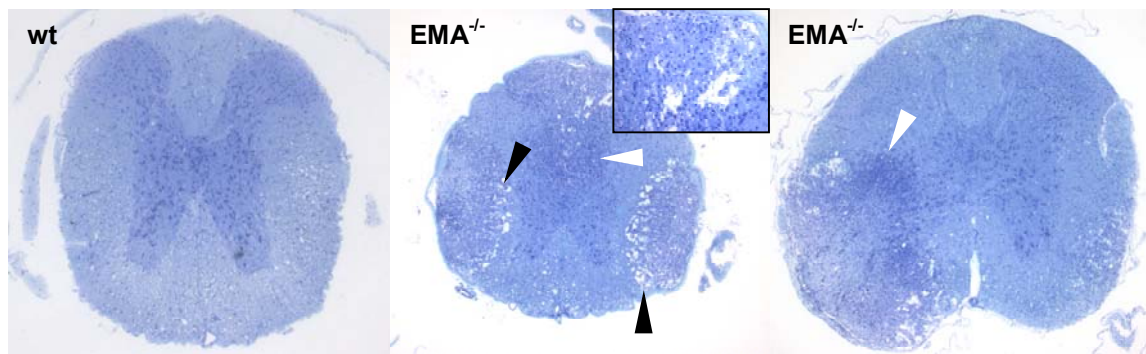


Abb. 14: **Das gesamte Rückenmark der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse weist Gewebläsionen in mehreren Arealen auf.**

Touluidin-Blau-gefärbte Semidünnschnitte des formalinfixierten Rückenmarks einer symptomatischen EMA/E2F-6-defizienten (EMA^{-/-}) Maus und einer altersgleichen Wildtyp-Maus. Zu erkennen sind die dunkel-gefärbte zentrale Schmetterlingsform der grauen Substanz und die umgebende weiße Substanz des Rückenmarks. Die vollen Pfeilköpfe zeigen auf die Zone der Läsionen; die leeren Pfeilköpfe zeigen auf die Einwanderungsfronten von Makrophagen. Der Bildausschnitt ist eine vergrößerte Aufnahme eines Areals mit Läsionen und infiltrierten Makrophagen.

EMA/E2F-6 ist mit dem Pc-G-Protein Bmi-1 zusammen in einem Komplex nachgewiesen worden (Trimarchi, et al., 2001). Bmi-1^{-/-}-Mäuse leiden an massiven neurologischen Defekten. Sie haben wie EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse eine Lähmung der hinteren Extremitäten, zeigen daneben aber Symptome wie einen ataktischen Gang und epileptische Krampfanfälle, die bei EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen nicht beobachtet wurden (van der Lugt, et al., 1994; van Lohuizen, 1998). Als eine Ursache sind im Kleinhirn, dem Zentrum für die Koordination von Bewegungsabläufen, eine reduzierte Stärke der Molekularschicht sowie eine verringerte Anzahl und deutlich geschrumpfte Purinje-Zellen beschrieben (Leung, et al., 2004; van der Lugt, et al., 1994). Im Kleinhirn von symptomatischen EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen waren die Molekular-, die Körner- und die Purkinjezellschicht sowie die Bergmann-Glia im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abb. 17). Eine morphometrische Analyse dieser Schichten bestätigte die Ergebnisse der histologischen Analyse (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu waren bei symptomatischen und nichtsymptomatischen EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen viele vakuolenartige Löcher aufgefallen. Obwohl auch im Wildtyp-Kleinhirn einige Löcher zu finden waren, waren sie nur im EMA/E2F-6^{-/-}-Kleinhirn von einem Ependym (einschichtige Gliazellschicht) ausgekleidet. Diese Löcher waren möglicherweise Fortsätze von Astrozyten (Makroglia), die aufgrund von aufgenommenem Wasser angeschwollen waren und so ein astrozytäres Ödem darstellen. Zusätzlich waren auch im Kleinhirn symptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse Makrophagen zu finden (Abb. 17).

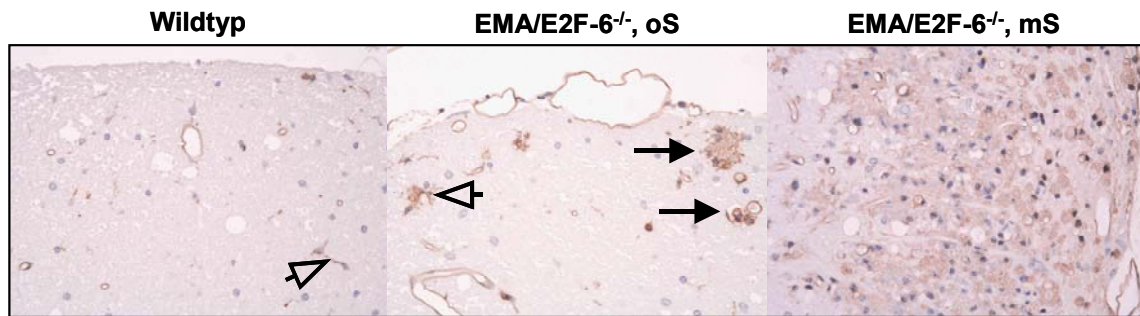


Abb. 15: **In das Rückenmark von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen sind Makrophagen eingewandert.** Lektinfärbung (braunes Reaktionsprodukt) zum Nachweis von Mikroglia. 40-fache Vergrößerung. Im Rückenmark von Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen sind Mikrogliazellen (ungefüllte Pfeile) sichtbar. In EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen ohne Symptome (EMA/E2F-6^{-/-}, oS) wurden damit vor allem Makrophagen, eine Zellform der Mikroglia, nachgewiesen (gefüllte Pfeile); in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen mit Symptomen (EMA/E2F-6^{-/-}, mS) traten die Makrophagen sogar massiv auf.

Die gelähmten Mäuse zeichneten sich neben den Bewegungsstörungen durch eine zunehmende Abmagerung aus. Ursachen dafür waren möglicherweise Bewegungsmangel und Probleme beim Erreichen des Futters. Die Abmagerung konnte zumindest zum Teil als eine Muskelatrophie histologisch dargestellt werden (Abb. 18). Kennzeichen der Atrophie waren, dass der Durchmesser einiger Muskelfasern deutlich reduziert war und sich zwischen den Muskelfasern teilweise große Zwischenräume gebildet hatten.

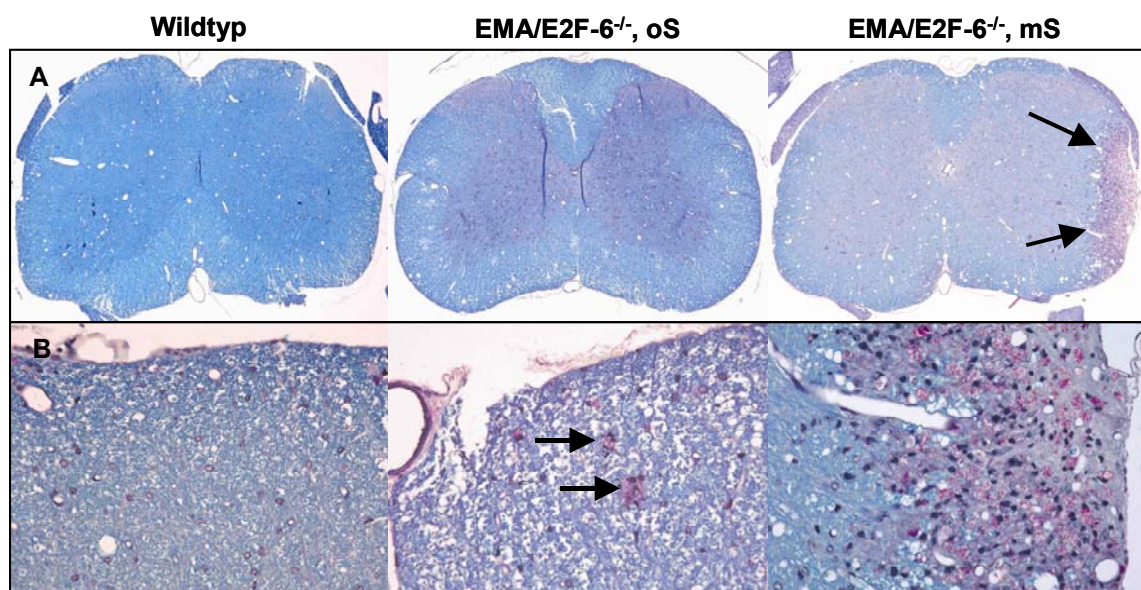


Abb. 16: **Eingewanderte Makrophagen enthalten abgebautes Myelin.** LFB/PAS-Färbung von Rückenmarksschnitten zur Darstellung von Myelinabbauprodukten (dunkelrosa Reaktionsprodukt). (A) Übersichtsabbildung (4-fache Vergrößerung) von thorakalen Rückenmarksschnitten; Seitenstrangläsion und Infiltration bei EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen mit (Pfeile) (B) 40-fache Vergrößerung der weißen Substanz des Rückenmarks, Das abgebaute Myelin ist in nicht-symptomatischen (EMA/E2F-6^{-/-}, oS) und symptomatischen EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen mit Symptomen (EMA/E2F-6^{-/-}, mS) mit Makrophagen kolokalisiert (Pfeile).

Die Veränderungen im Nervensystem wurden im Detail elektronenmikroskopisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Rückenmark symptomatischer und nichtsymptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse die

Myelinschichten degeneriert waren (Abb. 19). Die hier beobachteten verschiedenen Stadien der Demyelinisierung von Axonen sind als Zeichen eines primären Demyelinisierungsschadens (primärer axonaler Schaden) zu werten. So war die Myelinschicht für das umhüllte Axon häufig zu dünn (Abb. 19 B – D). Da die Myelinschicht unter anderem für die Erhaltung des Axons notwendig ist, stirbt das demyelinisierte Axon ab (sekundärer axonaler Schaden). Die axonale Degeneration äußerte sich in einem axonalen Transportschaden für Organellen: Ihre Anzahl pro Fläche war deutlich vermehrt, und es waren auch untergegangene Organellen zu finden (Abb. 19 C und D). Der bereits histologisch nachgewiesene Myelinabbau durch eingewanderte Makrophagen konnte elektronenmikroskopisch genauer aufgelöst werden (Abb. 19 B und D). So konnten innerhalb einer Myelinscheide sowohl Axon- als auch Makrophagenanteile identifiziert werden. Demzufolge waren die Makrophagen unter die Myelinschicht in das Axon gewandert und phagozytierten neben dem Myelin auch das Axon. Der primäre demyelinisierende Schaden war zusätzlich in einer reduzierten Kompaktheit des Myelins zu erkennen (Abb. 19 D und E). Auch im Kleinhirn wurden Zeichen des primären und sekundären axonalen Schadens wie das Missverhältnis von Axondurchmesser und Stärke des Myelins, die Anwesenheit von Makrophagen unter der Myelinschicht, die Auflockerung des Myelins und der axonale Transportschaden beobachtet (Abb. 20 B). Zusätzlich konnten die Hinweise aus der histologischen Analyse auf ein astrozytäres Ödem im Kleinhirn erhärtet werden (Abb. 20 C). So deutete die Anwesenheit von Zelltrümmern (wahrscheinlich residualer Zellorganellen) in dem ödematösen Raum um einen Astrozyten auf einen geschwollenen astrozytären Zellfortsatz hin. Die beschriebenen axonalen Schäden sind auch im Mittelhirn, im Hirnstamm und im motorischen Kortex gefunden worden (Daten nicht gezeigt).

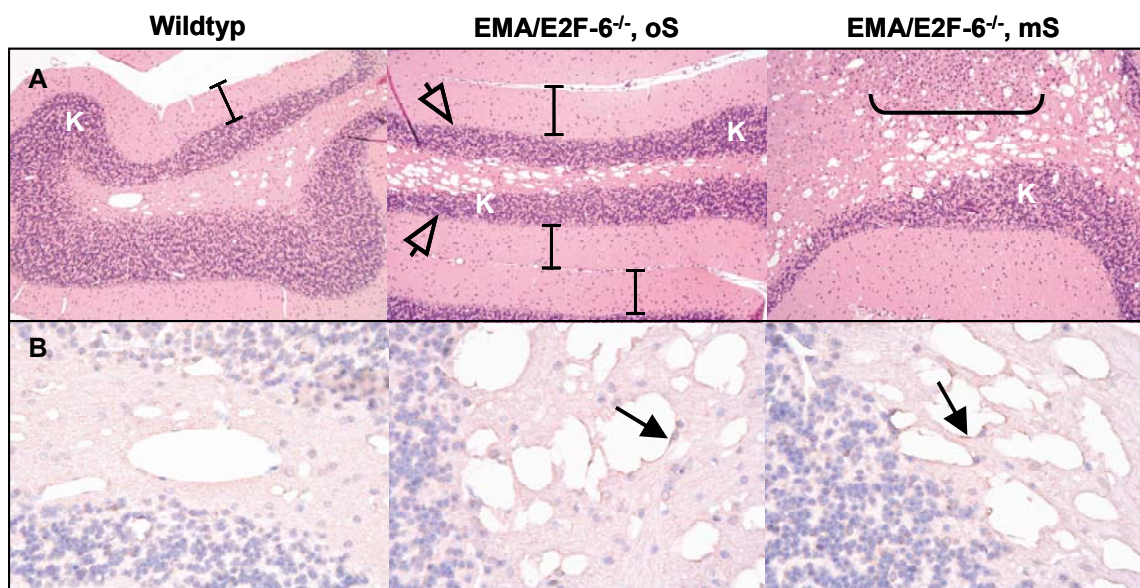


Abb. 17: **Histologische Analyse der weißen Substanz des Kleinhirns.** (A) Hämatoxylin/Eosin-Färbung, Die Molekular- (Balken) und die Körnerschicht (K) sowie der Anzahl der Purkinje-Zellen und der Bergmann-Glia (Pfeile) waren in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen unverändert. Es waren hier dagegen vermehrt vakulolenartige Löcher und eine Infiltration von Makrophagen (Klammer) zu finden. 10-fache Vergrößerung (B) GFAP-Färbung von Astrozyten (violett), Nur in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen waren die Löcher von Ependym ausgekleidet (Pfeile). 40-fache Vergrößerung.

Die Histologie der Spinalnerven hatte gezeigt, dass auch periphere Nerven EMA/E2F-6-defizienter Mäuse geschädigt waren. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des *Nervus ischiadicus* waren ebenfalls verschiedene Phasen einer primären Demyelinisierung zu sehen: 1) eine vollständig fehlende oder im Gegenteil 2) eine

zu massive Myelinscheide, 3) Axon-phagozytierende Makrophagen und 4) Myelintrümmer innerhalb eines Makrophages (Abb. 21). Zusätzlich wurden in peripheren Nerven in selteneren Fällen Remyelinisierung in Form einer Zwiebschalenstruktur der Schwannschen Zelle, die ein Axon umhüllt, beobachtet (Abb. 21 C). Diese Struktur ist bei alternierender De- und Remyelinisierung typisch und ist ebenfalls ein Zeichen eines primären Myelinschadens. Zupfpräparate sind eine spezielle Analyseform peripherer Nerven. Hier werden einzelne Nerven aus einem Nervenfaserbündel mit einer feinen Pinzette herausgezupft. Der Zustand eines einzelnen längeren Faserabschnitts kann so individuell beurteilt werden. Auch anhand der Zupfpräparate ließen sich primäre Demyelinisierungsprozesse der peripheren Nerven von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen darstellen (Abb. 22). Außerdem wurden Myelinovoide (fragmentiertes Myelin) als Charakteristika axonaler Schädigungen beobachtet. Diese Schäden sind aufgrund der nachgewiesenen primären Demyelinisierung sekundärer Natur (Abb. 22 C). Zusätzlich konnten auch mit den Zupfpräparaten multiple Remyelinisierungen (Zwiebschalenstrukturen) als Regenerationsprozesse der Myelinschicht beobachtet werden (Abb. 22 D).

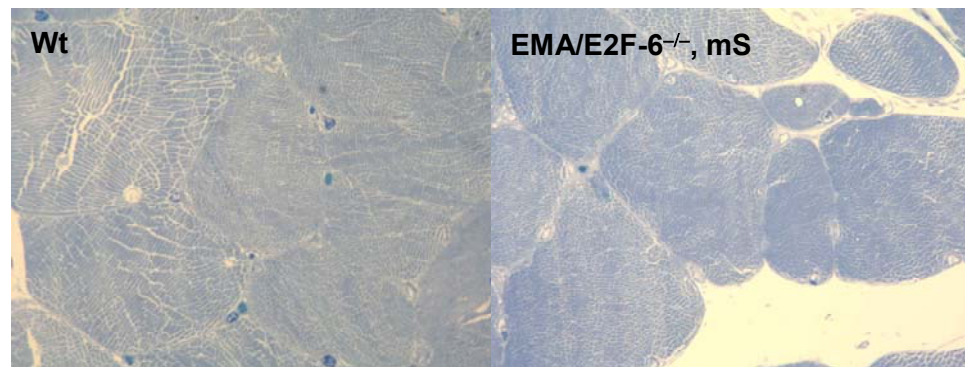


Abb. 18: **Atrophie der Skelettmuskulatur symptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse.** Präparat des *Musculus quadriceps*.

Die Untersuchung des neuropathologischen Phänotyps wurde mit einer morphometrischen Analyse ergänzt, die darüber Auskunft geben sollte, ob sich die Anzahlen der Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten infolge des Verlusts von EMA/E2F-6 verändert hatten. Die Mikroglia wurden mit einer Lektinfärbung, die Astrozyten mittels GFAP-Färbung (*glial fibrillary acidic protein*) und die Oligodendrozyten immunhistologisch über die myelinassoziierte 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP) identifiziert. Wie anhand der vorangegangenen histologischen Analysen zu erwarten war, waren in der weißen Substanz des Rückenmarks und des Kleinhirns alter symptomatischer und nichtsymptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse die Mikroglia, speziell die Makrophagen, im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Mäusen stark vermehrt (Abb. 23 A und Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der Astrozyten war in beiden Geweben bei alten EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen ebenfalls angestiegen (Abb. 23 B und Daten nicht gezeigt). Bei beiden Zelltypen war der Anstieg bei symptomatischen Mäusen gegenüber nichtsymptomatischen EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der myelinisierenden Zellen des ZNS, der Oligodendrozyten, im Rückenmark und auch im Kleinhirn dieser Mäuse reduziert (Abb. 23 C und D). Es ist zu betonen, dass ihre Anzahl bereits bei sechs Monate alten EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen verringert war, da in diesem Alter die Mäuse weder Lähmungen hatten noch bei ihnen pathologische Veränderungen beobachtet wurden. Auch hier war der Effekt bei den symptomatischen Mäusen stärker. Die Verringerung der Oligodendrozyten konnten auch in allen weiteren untersuchten Geweben – im motorischen Kortex, im subkortikalen Bereich und im Hippocampus – festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

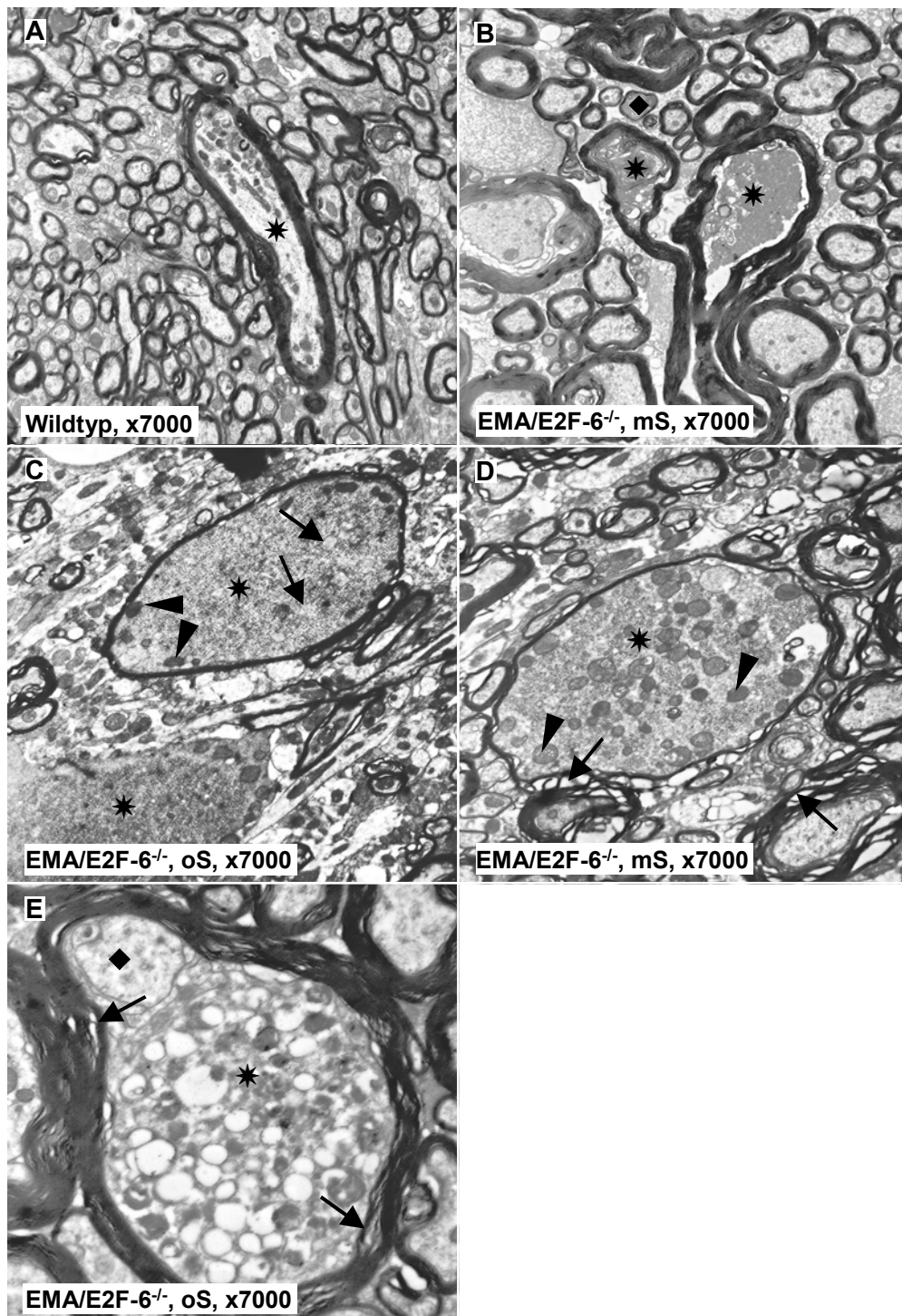


Abb. 19: **Primäre Demyelinisierungen im Rückenmark von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der weißen Substanz. Angegeben sind der Genotyp der Mäuse und die Vergrößerung der Aufnahmen. (A) Viele normal myelinisierte Axone mit einem longitudinal getroffenen Axon (Stern) (B) Longitudinal getroffenes Axon mit eingewanderten Makrophagen (Sterne), demyelinisiertes Axon mit zu geringer Stärke der Myelinscheide (Karo) (C) Zwei demyelinisierte geschwollene Axone (Sterne) mit einer Häufung von Organellen (Pfeilköpfe) und untergegangenen Organellen (Pfeile), Dem unteren geschwollenen Axon fehlt die Myelinschicht komplett. (D) Demyelinisiertes, geschwollenes Axon (Stern) mit einer Häufung von Organellen (Pfeilköpfe) und aufgelockerter Myelinscheide (Pfeil) (E) Residuales Axon (Karo) mit eingewandertem Makrophage (Stern) und aufgelockerter Myelinscheide (Pfeile).

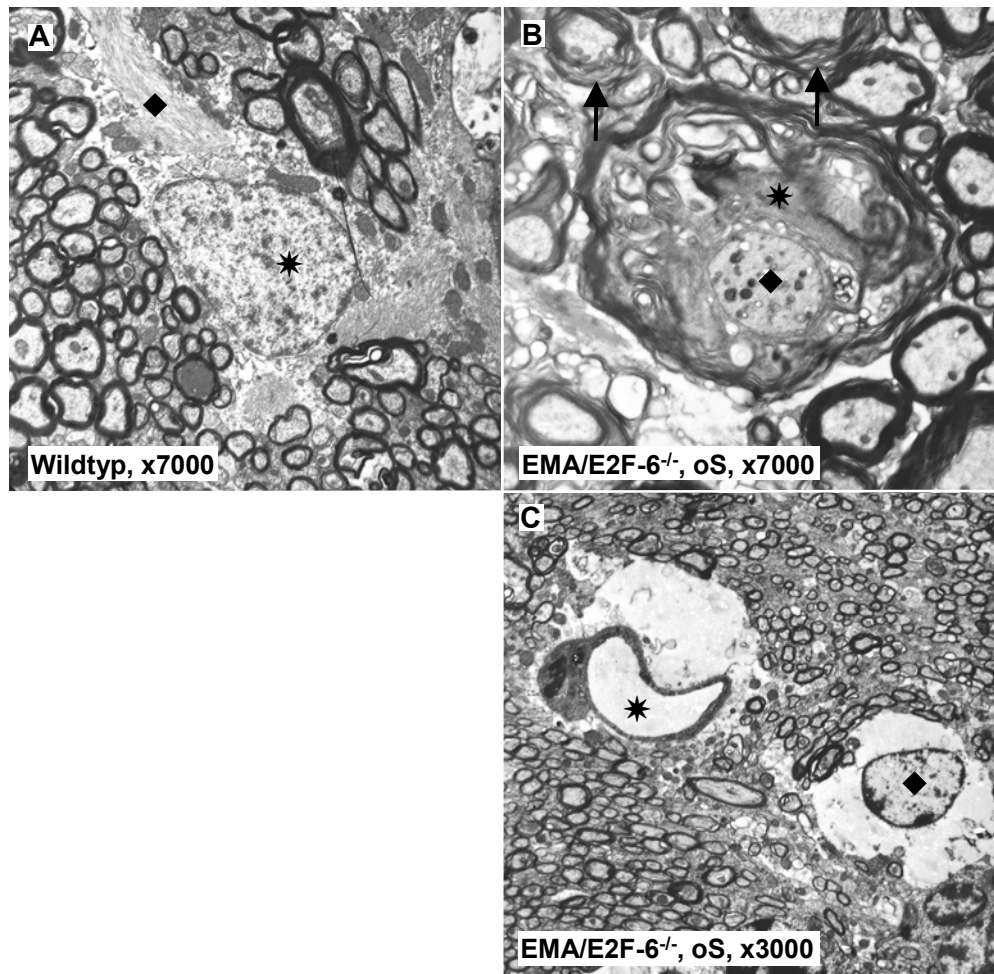


Abb. 20: **Primäre Demyelinisierungen im Kleinhirn von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der weißen Substanz. Angegeben sind die Genotypen der Mäuse und die Vergrößerungen der Aufnahmen. (A) Gesunder Astrozyt (Stern) mit Gliafasern (Karo), in seiner Umgebung normal myelinisierte Axone (B) Massiver Myelinabbau vieler Axone, aufgelockerte Myelinscheiden (Pfeile), zentral im Bild residuales Axon (Karo) mit untergewandertem Makrophagen (C) Astrozyt (Karo) mit astrozytarem Ödem, das wahrscheinlich mit perivaskulärem (Gefäß-assoziiert) Ödem (Stern) verbunden ist.

Oligodendrozyten können infolge der deregulierten Expression eines Myelinproteins untergehen (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Da nicht bekannt war, ob EMA/E2F-6 die Expression von Myelinproteinen kontrolliert, wurde der Frage im Rahmen einer DNA-Mikroarray-Analyse nachgegangen, die durchgeführt wurde, um EMA/E2F-6-Zielgene zu identifizieren. Die Analyse wird im Kapitel 3.5.1 „DNA-Mikroarray-Analyse“ vorgestellt. An dieser Stelle wird nur darauf verwiesen, dass dazu die Expressionshöhen von Genen in Wildtyp- und in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF (*murine embryonic fibroblasts*) verglichen wurden, um anhand von Unterschieden einen Hinweis auf eine EMA/E2F-6-abhängige Expressionskontrolle dieser Gene zu erhalten. In Tabelle 6 sind die Expressionsverhältnisse aller auf dem Array repräsentierten Myelinproteingene angegeben. Da EMA/E2F-6 ein Repressor ist, war bei einer direkten EMA/E2F-6-abhängigen Regulation ein Expressionsanstieg in den EMA/E2F-6-defizienten Fibroblasten zu erwarten. So war der Expressionsanstieg von *MBP* in asynchron wachsenden Fibroblasten um fast das Zehnfache erheblich und der Expressionsanstieg von *MAG* in in der G₀-Phase-arretierten MEF mit einem Faktor von 2,6 ebenfalls deutlich. Es muss erwähnt werden, dass die Daten in Tabelle 6 mit Bedacht behandelt werden müssen, da die entsprechenden Rohdaten der DNA-Mikroarray-Analyse nicht in allen Punkten den Qualitätsanforderungen entsprachen, um eine gesicherte Aussage über ihre gemessenen

Expressionsverhältnisse machen zu können (siehe Kapitel 3.5.1). Aus diesem Grund tauchen diese Gene nicht in der Zusammenfassung der Analyse (Tabelle 9) auf. Beispielsweise lagen die normierten Expressionshöhen von *MBP* in beiden asynchron wachsenden MEF-Populationen deutlich unter dem Schwellenwert von 500 und wurden daher prinzipiell jeweils als *Absent*-Expression gewertet. Dennoch können die Daten von *MBP* und *MAG* als erster Hinweis auf eine deregulierte Expression von Myelinkomponenten in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF berücksichtigt werden.

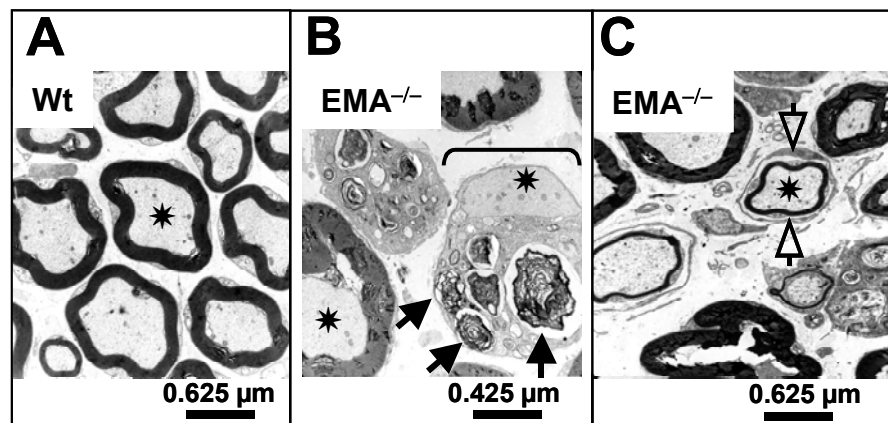


Abb. 21: Die Axone der peripheren Nerven von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen sind durch De- und Remyelinisierung gekennzeichnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *Nervus ischiadicus*. Mit Sternen sind Axone markiert. (A) Repräsentativer Querschnitt von gesunden Axonen. (B) Das Myelin wurde von einem Makrophagen aufgenommen. Die Pfeile zeigen auf Myelinreste innerhalb des Makrophagen, der unter die Myelinscheide eines Axons (Klammer) gewandert ist. Das Axon war inzwischen vollständig demyelinisiert. Außerdem ist ein Axon mit einer zu dicken Myelinschicht zu sehen (links unten im Bild). (C) Entmyelinisierte Axone begannen mit der Remyelinisierung. Leerer Pfeilkopf: solitäre Regeneratsfaser einer Schwannschen Zelle.

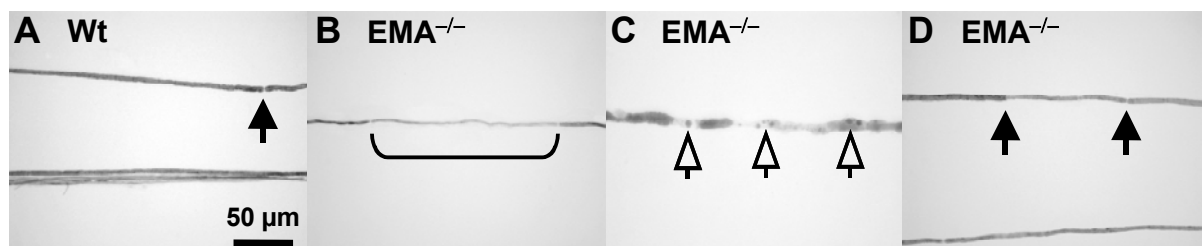


Abb. 22: Die Zupfpräparate zeigen eine primäre und sekundäre axonale Schädigung in den peripheren Nerven von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen. Präparat von *Nervus ischiadicus* (A) Nervenfasern mit Ranvierschem Schnürring (Pfeil). (B) Segmentale Demyelinisierung (Klammer) (C) Myelinovoide (Pfeile) (D) Verkürztes Internodium (Kalibersprung), Pfeile: Ranviersche Schnürringe.

An dieser Stelle werden die Ergebnisse der Analyse symptomatischer und altersgleicher nichtsymptomatischer EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse kurz zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass die weiße Substanz des ZNS, vor allem im Rückenmark und im Kleinhirn, sowie die peripheren Nerven dieser Tiere stark geschädigt waren. Die Myelinscheiden waren von einer primären Demyelinisierung, der eine sekundäre axonale Schädigung folgte, betroffen. Diese Schäden führten zum Untergang der Axone und letztlich zu einem Neuronenverlust. Außerdem wurde ein astrozytäres Ödem und eine Zunahme der Astrozytenzahl, wahrscheinlich als Reaktion auf

den Astrozytenverlust, beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Oligodendrozyten reduziert. Diese degenerativen Veränderungen wurden durch die massive Einwanderung von Makrophagen unterstützt. Die Makrophagen waren wahrscheinlich auch für die Entstehung der Läsionen im Rückenmark verantwortlich. Es handelte es sich jedoch nicht um einen entzündlichen Prozess, d. h. keine Autoimmunogenese, da keine Lymphozyten beobachtet worden sind. Die pathologischen Veränderungen waren sowohl bei gelähmten als auch bei nichtgelähmten EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen anzutreffen und waren bei ersteren stärker ausgeprägt.

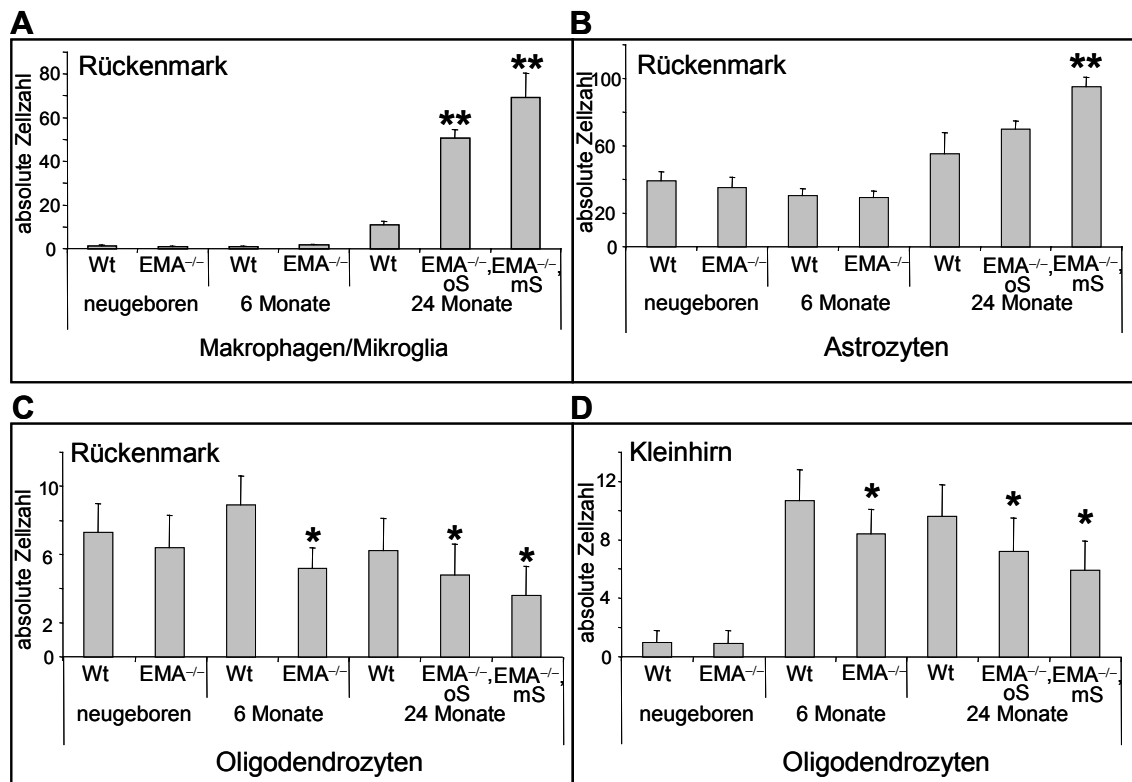


Abb. 23: **Morphometrische Analyse der Präsenz verschiedener neuronaler Zellen in der weißen Substanz des Rückenmarks und des Kleinhirns EMA/E2F-6-defizienter und altersgleicher Wildtyp-Mäuse verschiedenen Alters.** Ausgezählt wurden pro Maus (neugeboren und sechs Monate alt: n=2; 24 Monate alt: Wildtyp (Wt) und EMA/E2F-6^{-/-}, oS – n=3 und EMA/E2F-6^{-/-}, oS – n=5) zehn Gesichtsfelder bei einer 40- oder 100-fachen Vergrößerung. Die graphische Auswertung repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung. (A) Mikroglia (bei EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen waren es hauptsächlich Makrophagen) im Rückenmark, (B) Astrozyten im Rückenmark, (C) Oligodendrozyten im Rückenmark, (D) Oligodendrozyten im Kleinhirn. Statistische Analyse: ANOVA-Test gefolgt vom Tukey-Test, zwei Sterne: $P < 0,001$, ein Stern: $P < 0,003$.

3.4 Untersuchungen von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen auf Phänotypen Pc-G-Protein-defizienter Mäuse

3.4.1 Hämatopoetische Defekte

EMA/E2F-6 ist eine Komponente verschiedener Pc-G-Proteine-enthaltender Multiproteinkomplexe (siehe Kapitel 1.2.3 „EMA/E2F-6“). Mäuse, bei denen einzelne Gene dieser Proteingruppe inaktiviert wurden, haben mitunter dramatische Phänotypen, wie schwere Defekte der Hämatopoese, die Minderwuchs und einen frühen Tod verursachen (Akasaka, et al., 1997; van der Lugt, et al., 1994). So ist es denkbar, dass auch das Fehlen von

EMA/E2F-6 einen Einfluss auf die Funktionalität dieser Repressorkomplexe haben könnte (Jacobs and van Lohuizen, 2002). Zunächst wurde das periphere Blut EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse mittels eines Blutausstrichs untersucht und durch den Hämatologen Prof. Kulozik (Universität Heidelberg) gegengeprüft. Morphologisch und quantitativ unterschieden sich die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nicht von denen der Wildtyp-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden die B- und T-Zellpopulationen der peripheren und zentralen lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten und Thymus von Mäusen des 129/Ola-Stammes bestimmt. Ein reiner Stammhintergrund ist bei immunologischen Analysen sehr zum Vorteil, da so die genetische Variabilität individueller Mäuse, die einen gemischten Hintergrund haben, eliminiert werden kann (Dr. Scheffold, persönliche Mitteilung). Dieses Experiment und das anschließende Lymphozyten-Proliferationsexperiment wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Scheffold mit Unterstützung von Herrn Diplom-Chemiker dela Rosa (DRFZ, Berlin) durchgeführt. Die Subpopulationen der Lymphozyten wurden über ihre spezifischen Oberflächenantigene (Marker) durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper durchflusszytometrisch identifiziert. B-Lymphozyten sind B220⁺, zytotoxische T-Zellen sind CD8⁺, T-Helferzellen sind CD4⁺, und reife Thymozyten sind CD4⁺CD8⁺. Der Vergleich der Subpopulationen von EMA/E2F-6-defizienten Mäusen und von Kontrollmäusen zeigte, dass nur der Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der Lymphknoten unwesentlich (ca. um die Hälfte reduziert) verändert war (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6: Expressionsverhältnisse von Proteinkomponenten des ZNS-Myelins in EMA/E2F-6^{-/-} und Wildtyp-MEF ermittelt durch eine DNA-Mikroarray-Analyse

| Gen | Symbol | Expressionsverhältnis EMA/E2F-6 ^{-/-} :Wt MEF | |
|----------------------------------|--------------|--|--|
| | | asynchrone Population | in G ₀ -arretierte Population |
| Basisches Myelinprotein | <i>MBP</i> | 9,3 | 0,5 |
| Proteolipidprotein | <i>PLP</i> | 1,2 | 1,3 |
| Isoform des Proteolipidproteins | <i>DM-20</i> | 2,0 | 1,1 |
| Myelin-assoziiertes Glykoprotein | <i>MAG</i> | 1,1 | 2,6 |
| Myelin-Oligodendrozytenprotein | <i>MOG</i> | 1,5 | 1,0 |

Die Mengen unreifer und differenzierter Bmi-1-negativer B- und T-Zellen sind dramatisch verringert, und die differenzierten Zellen reagieren auf eine mitogene Stimulation im Vergleich mit Wildtyp-Zellen nur mit einer zehnfach niedrigeren Proliferationsrate (van der Lugt, et al., 1994). Um die Proliferationsrate von EMA/E2F-6^{-/-}-Lymphozyten zu bestimmen, wurde jeweils eine gemeinsame Zellsuspension aus den Thymi, Milzen und Lymphknoten von je drei EMA/E2F-6^{-/-} und Wildtyp-Mäusen des 129/Ola-Stammes präpariert und daraus die T-Helferzellen mit an eine magnetische Matrix gekoppelter CD4-Antikörper automatisch isoliert. Von dem Isolat wurde dann die Proliferationsrate bestimmt. Dazu wurden sie in Anwesenheit teilungsinhibierter Antigen-präsentierender Zellen (APC), die ebenfalls aus der Zellsuspension der Wildtyp-Mäuse gewonnen wurden, entweder mit 0,001 µg/ml (Kontrolle) bzw. 0,1 µg/ml CD3-Antikörper allein oder in Kombination mit 1,5 µg/ml CD28-Antikörper, der als Kostimulator fungiert, stimuliert. Beide Antikörper erkennen die Antigen-präsentierenden Zellen und können so an deren Oberfläche binden. Die CD4-positiven T-Zellen binden diesen Komplex aus Antikörpern und APC und werden dadurch zur Proliferation angeregt. Eine Färbung der Zellen mit dem permeablen Fluoreszenzfarbstoff CFDA (Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester) ermöglichte eine direkte Messung der Teilungsrate jeder einzelnen Zelle, da sich die Intensität des Fluoreszenzsignals bei jeder Zellteilung halbiert (Lyons and Parish, 1994) (Abb. 5). Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und erneut

mit einem Fluoreszenz-gekoppelten CD4-Antikörper markiert, um die T-Helferzellen von den kokultivierten APC in der Durchflusszytometrie, mit der gleichzeitig das CFDA-Signal detektiert wurde, trennen zu können (Abb. 24 A). Infolge der Gabe einer sehr geringen Menge (0,001 µg/ml) an CD3-Antikörper verblieben die meisten Zellen beider Genotypen in der Ruhephase (Daten nicht gezeigt). Nach der anti-CD3-vermittelten Stimulation war die Proliferationsrate der EMA/E2F-6^{-/-}-Lymphozyten um 29 % niedriger als die der Wildtyp-Lymphozyten (Abb. 24 B, t-Test: $P=0,001$). Die Kostimulation mit einem CD28-Antikörper regte zwar beide Zellpopulationen zu einer intensiveren Proliferation an, aber der Unterschied in der Proliferationsrate blieb bestehen (27 %, $P=0,02$). Die reduzierte Proliferationsrate der EMA/E2F-6^{-/-}-T-Lymphozyten konnte in mehreren unabhängigen Experimenten reproduziert werden; in einem Wiederholungsexperiment wurden die Zellsuspensionen der drei Mäuse nicht vereint, sondern getrennt behandelt.

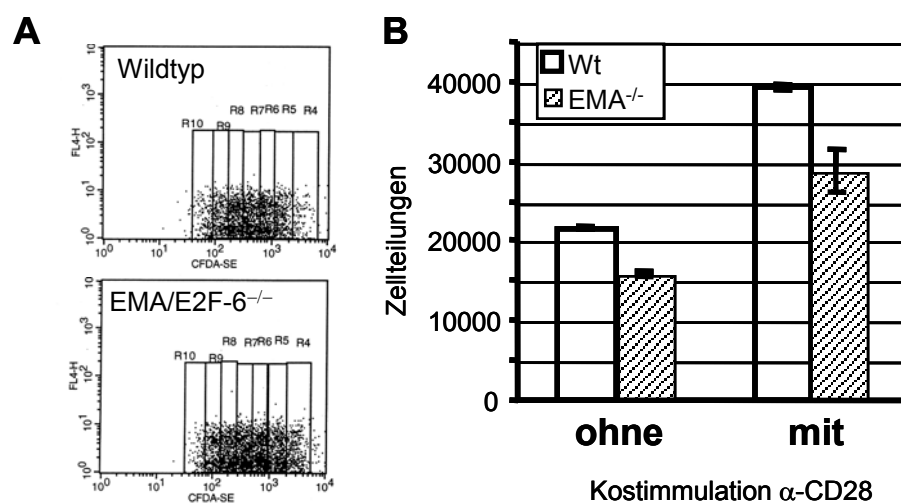


Abb. 24: **Die Proliferationsrate von EMA/E2F-6^{-/-}-T-Lymphozyten ist erniedrigt.** Die Proliferationsrate wurde *ex vivo* in einem Proliferationsexperiment bestimmt. Dazu wurden die Lymphozyten aus den Lymphknoten, der Milz und dem Thymus von je drei Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen isoliert und pro Genotyp der Mäuse vereint. Die Lymphozyten wurden durch Zugabe von 0,1 µg/ml CD3-Antikörper zur Proliferation angeregt. Kostimuliert wurde mit 1,5 µg/ml CD28-Antikörper. (A) Graphische Darstellung je eines Ansatzes als Anschauungsbeispiel der Ausgabe des Computerprogramms CellQuest von CFDA-markierten (CFDA-SE-Kanal des Durchflusszytometers) CD4-positiven (FL4-Kanal) T-Lymphozyten nach Stimulation. Die Felder R4 bis R10 repräsentieren die Zellteilungs-generationen; in R4 sind Zellen, die sich noch in der Ruhephase des Zellzyklus befanden; in R10 sind Zellen, die sechs Teilungen durchlaufen hatten. (B) Graphische Auswertung eines repräsentativen Proliferations-experiments. Die Graphik gibt den Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei Mäusen pro Genotyp mit drei Parallelansätzen an.

Die Reduktion der Proliferationsrate kann dadurch bedingt worden sein, dass entweder eine Subpopulation der T-Zellen nicht proliferiert war (Ruhephase, entspricht dem Feld R4 in der CellQuest-Auswertung) oder dass alle Zellen weniger proliferiert waren. Bei den EMA/E2F-6-negativen Lymphozyten war das Verhältnis proliferierender zu nicht proliferierenden Zellen geringer als bei den Wildtyp-Zellen, d. h. es waren mehr EMA/E2F-6^{-/-}-Zellen in der Ruhephase verblieben. Die Intensität der Proliferation war dagegen bei beiden Zellpopulationen annähernd gleich (Tabelle 7). Sie wurde bestimmt, indem das Verhältnis aller proliferierender Zellen zu den Zellen, die stark proliferiert waren (fünf und sechs Zellteilungen, entspricht den Feldern R9 und R10), ermittelt wurde. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die relativen Mengen von Blutzelltypen in

EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen nicht deutlich verändert waren, aber EMA/E2F-6-negative T-Lymphozyten im Vergleich mit Wildtyp-Lymphozyten mit einer um ca. 25 % erniedrigten Proliferationsrate auf einen Stimulationsreiz reagierten. Allerdings fiel diese Reduktion deutlich niedriger aus als der veröffentlichte zehnfache Unterschied zwischen Bmi-1^{-/-}- und Wildtyp-Lymphozyten. Die verringerte Proliferationsrate EMA/E2F-6-negativer Lymphozyten konnte auf einen erniedrigten Anteil an Zellen, die zur Proliferation angeregt wurden, zurückgeführt werden.

Tabelle 7: EMA/E2F-6^{-/-}-T-Lymphozyten werden zu einem geringeren Teil zur Proliferation angeregt.

| Verhältnis | Kostimulation | Wildtyp-Lymphozyten | EMA/E2F-6 ^{-/-} -Lymphozyten |
|--|-----------------------|---------------------|---------------------------------------|
| prolif. Zellen/ Zellen in G ₀ | — + α -CD28 | 5,1±0,2 24±0,4 | 3,4±0,1 10,4±1,0 |
| alle prolif. Zellen/ stark proliferierende Zellen | — + α -CD28 | 4,1±0,2 5,0±0,1 | 5,8±0,3 5,5±0,6 |

3.4.2 Transformationen von Wirbelkörpern

Mäuse mit verschiedenen inaktivierten Pc-G-Genen haben posteriore Transformationen der Wirbelkörper und in einigen Fällen Deformationen des Gliedmaßen- und des Schädelskeletts (Akasaka, et al., 1996; Akasaka, et al., 2001; van der Lugt, et al., 1994). Posteriore Transformationen sind durch die Transformation eines Wirbels in den in kaudaler Richtung folgenden Wirbel (der posteriore) charakterisiert. Verursacht werden sie durch eine Verschiebung der Expressionsgrenzen verschiedener *Hox*-Gene in rostraler Richtung im paraxialen Mesoderm, die zu einer Verschiebung der Segmentgrenzen im Organismus führt. Um eine Rolle von EMA/E2F-6 bei der Wirkung von Pc-G-Proteinen und damit bei der Festlegung der Identität von Wirbelkörpern zu untersuchen, wurden die Skelette neugeborener EMA/E2F-6^{-/-}-, EMA/E2F-6^{+/-}- und Wildtyp-Mäuse präpariert und analysiert. Nachdem die Skelette durch basische Mazeration gesäubert waren, wurden sie gefärbt. Es konnten viele der Wirbeltransformationen, die beispielsweise von Bmi-1^{-/-}- und von Mel-18^{-/-}-Mäusen beschrieben sind, wie die Transformation von C7 zu T1, von T13 zu L1 oder von L6 zu S1 auch in EMA/E2F-6^{+/-}- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen entdeckt werden: (Abb. 25). Außerdem wurden die beschriebenen Deformationen des Atlas- und des Axiswirbels, bei denen unklar ist, ob es sich um echte Transformationen handelt, beobachtet (Abb. 25 B und C). Überraschend war, dass viele der Veränderungen auch in den Wildtyp-Skeletten gefunden wurden. Die Häufung war hier so groß, dass sich kein statistisch signifikanter Anstieg von Transformationen in EMA/E2F-6^{+/-}- und EMA/E2F-6^{-/-}-Skeletten ergab (Tabelle 8). Schlussfolgernd hat EMA/E2F-6 somit keine limitierende Funktion bei der korrekten Ausbildung von Wirbelkörpern.

3.5 Identifizierung von EMA/E2F-6-Zielgenen

3.5.1 DNA-Mikroarray-Analyse

Die Funktionen eines Transkriptionsfaktors werden durch die Gene bestimmt, deren Expression er kontrolliert. Für die Suche nach EMA/E2F-6-Zielgenen wurde die DNA-Mikroarray-Technologie gewählt, mit der

parallel das Expressionsprofil von tausenden Genen analysiert werden kann. Zunächst galt es, dafür ein geeignetes System zu finden. MEF erschienen geeignet, da sie Primärzellen sind und verhältnismäßig leicht isoliert und kultiviert werden können. Ein weiterer Vorteil war, dass aus den eben genannten Gründen bereits für ihre Analyse eine Vielzahl an Bedingungen bekannt sind. Vorher mußte noch geklärt werden, ob MEF auch aufgrund ihrer EMA/E2F-6-Expressionshöhe in einer Zielgensuche eingesetzt werden konnten. Die EMA/E2F-6-Expression wurde mit einem RPA in einer asynchron wachsenden MEF-Kultur, in der G₀-Phase-arretierten MEF und zum Vergleich zusätzlich in einigen Geweben bestimmt, da bereits bekannt war, dass EMA/E2F-6 im Herz und im Skelettmuskel verhältnismäßig stark und in der Milz schwach exprimiert wird (Cartwright, et al., 1998; Kherrouche, et al., 2001; Trimarchi, et al., 1998). Die verwendete RNA-Sonde wurde bereits im Kapitel 3.1.2 „Generierung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse“ beschrieben. Um die Zellen in die G₀-Phase zu bringen, wurde der Serumgehalt einer seit drei Tagen konfluenten Kultur für 56 Stunden von 10 % auf 0,2 % gesenkt. Dieses spezielle Protokoll – standardmäßig wird bei subkonfluenten Zellen das Serum reduziert – wurde aus der Publikation (Ogawa *et al.*, 2002) entnommen, in der die Autoren eine EMA/E2F-6-spezifische Funktion in der G₀-Phase vorschlagen. In allen Experimenten wurden MEF mit drei oder vier Kulturpassagen verwendet, da MEF in höheren Passagen in einen als Seneszenz bezeichneten Teilungsstop übergehen. Der RPA zeigte, dass die EMA/E2F-6-Expression in MEF im Vergleich mit den Geweben hoch ist und sie sich somit bei der Suche nach EMA/E2F-6-Zielgenen eignen (Abb. 26).

Tabelle 8: Zusammenfassung der Skelettanomalitäten

| Skelettanomalitäten | | Penetranz (%) | | | | |
|-------------------------|--------------|---------------|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | | WT (n=19) | EMA ^{+/-} (n=15) | P ^a | EMA ^{-/-} (n=22) | P ^a |
| C1 abnormal | eine Seite | 0 | 0 | - | 5 | 1 |
| C2 abnormal | eine Seite | 5 | 7 | 1 | 18 | 0,4 |
| C7 → T1 | eine Seite | 11 | 0 | 0,5 | 5 | 0,2 |
| | beide Seiten | 0 | 0 | - | 5 | 1 |
| C7 → T1 (unvollständig) | eine Seite | 32 | 40 | 0,7 | 41 | 0,7 |
| | beide Seiten | 53 | 33 | 0,3 | 23 | 0,06 |
| 8 vertebrosterne Rippen | eine Seite | 0 | 0 | - | 9 | 0,5 |
| Rudimentäre Rippen T13 | eine Seite | 5 | 20 | 0,3 | 9 | 1 |
| | beide Seiten | 5 | 0 | 1 | 27 | 0,1 |
| L6 → S1 | eine Seite | 5 | 0 | 1 | 14 | 0,6 |
| | beide Seiten | 32 | 60 | 0,2 | 55 | 0,2 |

^a: Exakter Test nach Fischer

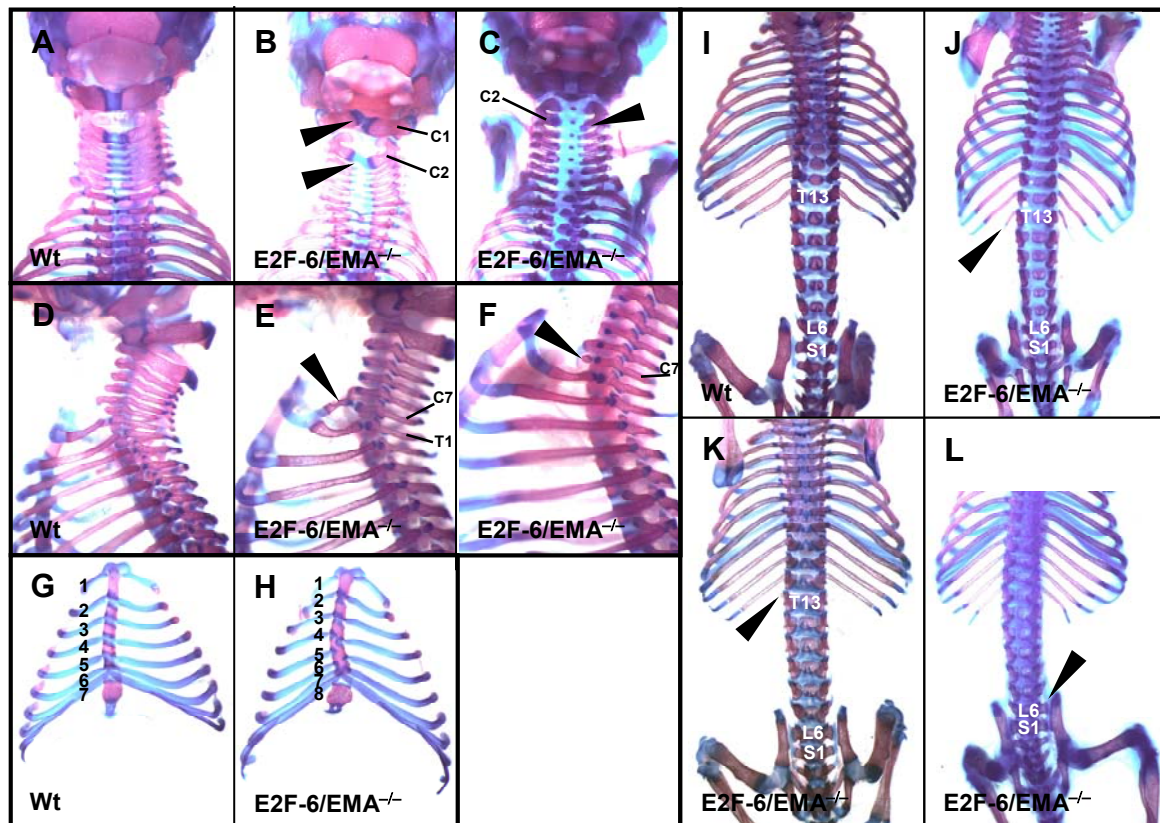


Abb. 25: **Darstellung des Skeletts von neugeborenen Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen.** Die Knochen wurden mit Alizarin Rot und der Knorpel mit Alcain Blau gefärbt. Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen auf Wirbelveränderungen. (A-C) Dorsale Sicht auf den zervikalen Bereich: (B) Die knöchernen Anteile von Atlas [C1] und Axis [C2] sind zueinander verschoben und der Axis ist gesplittet bzw. (C) verjüngt. (D-F) Laterale Sicht auf den okzipito-zerviko-thorakalen Bereich: (E) Der siebte zervikale Wirbel [C7] ist mit einer vertebrosternalen Rippe verbunden, die ventral mit der Rippe des ersten thorakalen Wirbels [T1] fusioniert. (F) C7 ist mit einem rudimentären Rippenstück assoziiert. (G, H) Ventrale Sicht auf das Brustbein und die ventralen Rippenstücke: (H) Rechtsseitig existiert eine zusätzliche vertebrosternale Rippe. Die Verknöcherungszentren sind gesplittet und in rostro-kaudaler Richtung verschoben. (I-L) Ventrale Sicht auf den thorako-lumbo-sakralen Bereich: (J) Am dreizehnten thorakalen Wirbel [T13] befinden sich degenerierte Rippen. (J, K) Der sechste lumbale Wirbel [L6] ist zum ersten sakralen Wirbel [S1] transformiert. (K) Die Rippen an T13 fehlen vollständig. (L) Eine Seite von L6 ist zu S1 transformiert.

Die DNA-Mikroarray-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité durchgeführt. Auf dem eingesetzten genomischen DNA-Mikroarray U74Av2 der Firma Affymetrix sind kurze Abschnitte von ca. 6000 bekannten Genen und ca. 6000 EST-Cluster nicht charakterisierter Gene (*Expressed Sequence Tag*) der Maus immobilisiert. Expressionsunterschiede einzelner Gene zwischen EMA/E2F-6^{-/-}- und Wildtyp-MEF wurden als Hinweise auf eine EMA/E2F-6-abhängige Transkriptionsregulation dieser Gene gewertet. Für einen signifikanten Expressionsunterschied mußte jedes Signalpaar (von den EMA/E2F-6^{-/-}- und den Wildtyp-Zellen) eines Gens drei Qualitätsanforderungen erfüllen: (1) Der Wert eines normierten Signals mußte größer als 500 sein (*present signal*); besser war, wenn beide Signale *present* waren; bei *Absent/Present*-Paaren mußte die Differenz der Werte größer als 1000 sein. (2) Der Quotient der normierten Werte mußte größer als 2 bzw. kleiner als 0,5 sein. (3) Jedes Gen bzw. jedes EST war mit jeweils 16 verschiedenen 25-meren Oligonukleotiden, die aus der 3'-UTR des Gens stammten, auf dem DNA-Mikroarray präsent. Dazu gab es jeweils die entsprechenden Kontrolloligonukleotide, bei denen die 13. Position substituiert

war. Die Gesamtheit der Qualität der Signalintensitäten aller 32 Oligonukleotide eines Gens wird als „*Detection p-Value*“ bezeichnet. Dieser Wert mußte für *Present*-Signale kleiner als 0,005 und für *Absent*-Signale größer als 0,6 sein. Für die Analyse wurden die Expressionsprofile von asynchron wachsenden und von in G₀-arretierten Zellen verglichen, da EMA/E2F-6 sowohl in der S- als auch in der G₀-Phase mit Promotoren assoziiert ist (Giangrande, et al., 2004; Ogawa, et al., 2002). In der Tabelle 9 sind die Gene aufgelistet, die in EMA/E2F-6^{-/-}- und Wildtyp-MEF verschiedene Expressionshöhen hatten und den eben genannten drei Qualitätsanforderungen genügt haben.

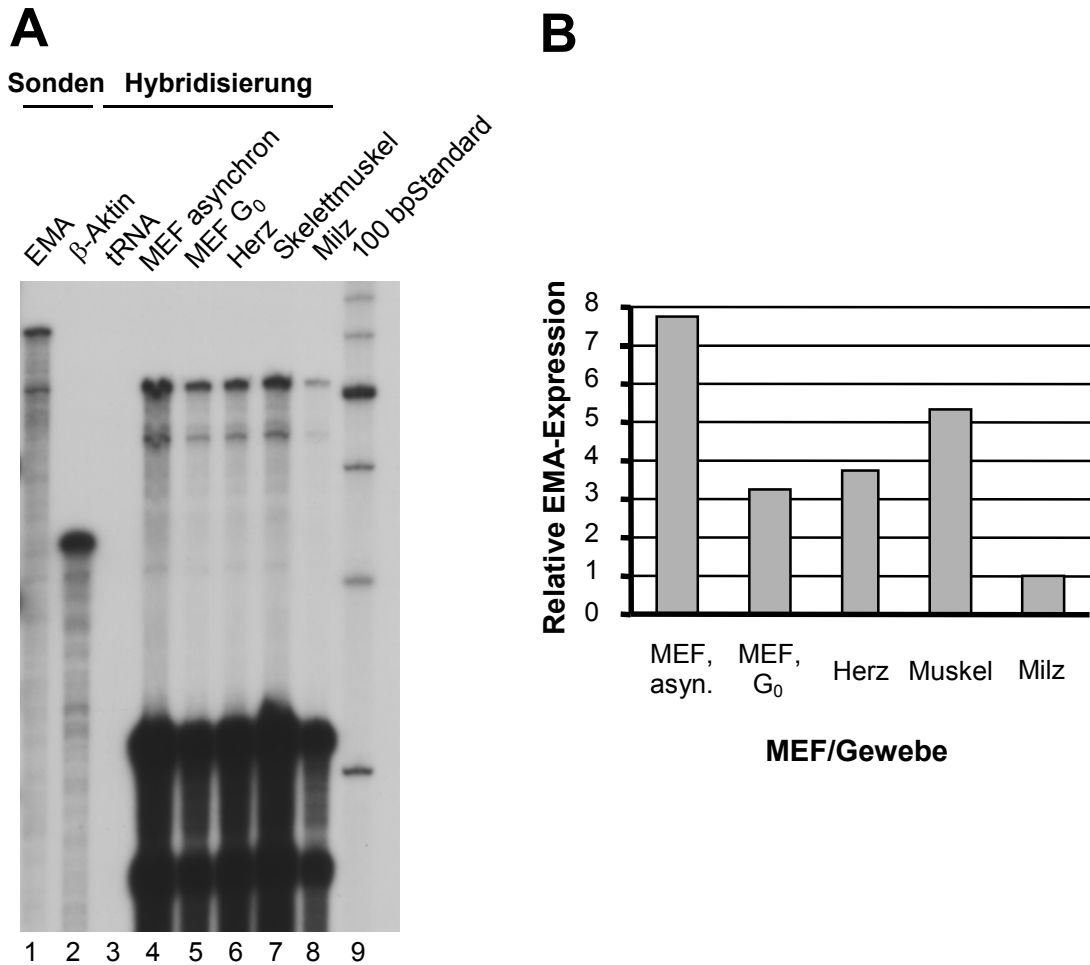


Abb. 26: **Analyse der EMA/E2F-6-Expression in MEF.** (A) RPA von Gesamt-RNA aus asynchron wachsenden sowie in der G₀-Phase-arretierten MEF und Mausgeweben. Die unbehandelten Sonden sind beschriftet. β-Aktin wurde als interner Standard eingesetzt. Die Hybridisierungsreaktion mit tRNA aus Hefe diente als Spezifitätskontrolle. (B) Quantifizierung mittels Phosphoimager der EMA/E2F-6-Expression im Verhältnis zur Expression von β-Aktin.

Tabelle 9: Mittels DNA-Mikroarray-Analyse bestimmte als in EMA/E2F-6-/-MEF dereguliert exprimierte Gene

| Bezeichnung Protein bzw. EST-Code | UniGene - Code | Verhältnis EMA ^{-/-} /Wt | Affymetrix-Code |
|--|----------------|-----------------------------------|-----------------|
| asynchrone Zellpopulation | | | |
| alpha-Tubulin isotype M-alpha-7 | Mm.89866 | 5,7 | 93924_f_at |
| Distal intestinal serine protease (DISP) | Mm.86470 | 0,2 | 93709_at |
| Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) | Mm.1263 | 0,2 | 94147_at |
| Tolloid-like | Mm.5076 | 0,3 | 98850_at |
| Calmodulin-like 4 (Calml4) | Mm.28623 | 2,5 | 96203_at |
| Mouse glutathione S-transferase class mu (GST5-5) | Mm.14601 | 2,5 | 93009_at |
| Cardiac ankyrin repeat protein MCARP | Mm.10279 | 0,4 | 102048_at |
| Glucocortoid-regulated inflammatory prostaglandin G/H synthase (griPGHS) | Mm.3137 | 0,4 | 104647_at |
| Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide | Mm.4146 | 0,4 | 160867_at |
| Fibroblast inducible secreted protein | Mm.1810 | 0,4 | 93294_at |
| EST: AA867778 | | 0,4 | 92280_at |
| EST: AI451008 | | 0,4 | 95887_at |
| Ring finger protein 2 (Rnf2) | Mm.31512 | 0,4 | 97506_at |
| EST: AA600468 | | 0,4 | 97083_at |
| EST: AI845935 | | 0,4 | 97458_at |
| Serum amyloid A 3 | Mm.14277 | 2,4 | 102712_at |
| Growth arrest specific 2 | Mm.25 | 2,3 | 94337_at |
| EST: AI849676 | | 2,3 | 97888_at |
| Small inducible cytokine B subfamily, member 5 | Mm.4660 | 2,2 | 98772_at |
| Mus musculus secreted frizzled related protein sFRP-2 (Sfrp2) | Mm.19155 | 2,2 | 93503_at |
| EST: AV218205 | | 2,2 | 161522_i_at |
| EST: AI315647 | | 2,1 | 103570_at |
| EST: AV008547 | | 2,1 | 162176_r_at |
| EST: AW120976 | | 2,0 | 160530_at |
| Kinesin heavy chain member 5B, ubiquitous | Mm.3380 | 0,5 | 160417_at |
| Core binding factor alpha 2 | Mm.4081 | 0,5 | 92399_at |
| Spermidine/spermine N1-acetyl transferase | Mm.2734 | 0,5 | 96657_at |
| EST: Z31360 | | 0,5 | 101168_at |
| EST: AI853261 | | 0,5 | 160458_at |
| EST: AV334573 | | 0,5 | 162249_f_at |
| in der G₀-Phase arretrierte Population | | | |
| Tetranectin (plasminogen-binding protein) | Mm.34588 | 40,2 | 92224_at |
| Ly-6 alloantigen (Ly-6E.1) | Mm.15889 | 3,8 | 93078_at |
| Cyclin I | Mm.22711 | 0,3 | 94820_r_at |
| C1D protein | Mm.2485 | 0,3 | 95479_at |
| High mobility group protein I, isoform C | Mm.3953 | 0,3 | 99058_at |
| EST: AV232133 | | 0,3 | 161177_f_at |
| Cytohesin 2 (CLM2) | Mm.19097 | 2,9 | 93492_at |
| Dermatopontin (Dpt) | Mm.28935 | 2,8 | 96742_at |
| Hephaestin (heph) | Mm.27494 | 2,7 | 104194_at |
| Apolipoprotein D | Mm.2082 | 2,7 | 93592_at |
| Mesenchyme homeobox 2 | Mm.4346 | 2,6 | 99937_at |
| Complement component 1 inhibitor | Mm.38888 | 2,5 | 99081_at |
| Kinesin heavy chain member 5B, ubiquitous | Mm.3380 | 0,4 | 160417_at |
| Phosphatase and tensin homolog | Mm.1591 | 0,4 | 160614_at |
| Protein L | Mm.9043 | 0,4 | 95232_at |
| CD82 antigen | Mm.4261 | 0,4 | 99584_at |
| EST: AI842667 | | 0,4 | 101020_at |
| EST: AI504305 | | 0,4 | 102104_f_at |
| EST: AI195392 | | 0,4 | 104579_r_at |
| EST: AV230686 | | 0,4 | 162362_f_at |
| EST: M74123 | | 0,4 | 94224_s_at |
| Procollagen, type XV | Mm.4352 | 2,3 | 99637_at |
| Heparan sulfate glucosaminyl 3-O-sulfotransferase | Mm.12559 | 2,2 | 102410_at |
| Stem cell growth factor | Mm.20428 | 2,1 | 103244_at |
| GT12 protein | Mm.23675 | 2,1 | 160172_at |
| Flavin-containing monooxygenase | Mm.976 | 2,1 | 101991_at |
| Secreted frizzled related protein sFRP-2 (Sfrp2) | Mm.19155 | 2,1 | 93503_at |
| Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (Erbb3) | Mm.29023 | 2,1 | 96771_at |
| semaphorin E | Mm.5071 | 2,0 | 101178_at |
| DLK1-like homolog (Drosophila) | Mm.95633 | 2,0 | 101975_at |
| HMG-17 chromosomal protein13 | Mm.911 | 0,5 | 101589_at |
| Small fragment nuclease (Smfn) | Mm.21911 | 0,5 | 94034_at |
| Cyclin D2 | Mm.3141 | 0,5 | 97504_at |
| EST: AW125190 | | 0,5 | 98945_at |

Da EMA/E2F-6 ein Repressor ist, waren hauptsächlich jene Gene interessant, die in EMA/E2F-6-negativen Zellen hochreguliert waren, da hier ein direkter Einfluss von EMA/E2F-6 wahrscheinlich war. In EMA/E2F-6^{-/-}-MEF war in der Tat eine Reihe von Genen aktiviert, von denen der Isotyp des α -Tubulins M7 (TUBA7), *Tetranektin* und *Ly-6-Alloantigen* (Ly-6E) sehr stark aktiviert waren. Die Expression der *Distalen Serinprotease des Darms* (DISP) und des *Plasminogenaktivators* (PAI-1) waren in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF im Gegensatz dazu deutlich reduziert. Bemerkenswert ist außerdem, dass mit *Kinesin heavy chain member 5B* nur ein Gen sowohl in asynchronen als auch in G₀-arrestierten MEF dereguliert war.

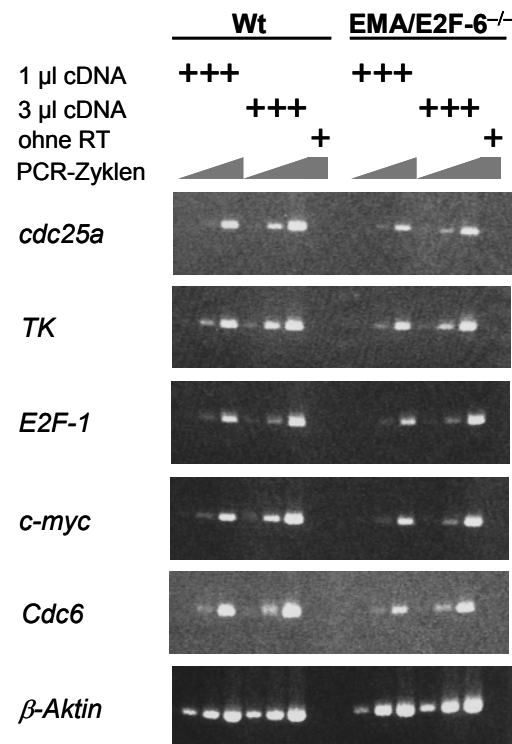


Abb. 27: Die Expression klassischer E2F-Zielgene ist in EMA/E2F-6-defizienten Fibroblasten nicht verändert. Die Transkriptmengen der Gene *cdc25a*, *Thymidinkinase* (*TK*), *E2F-1*, *c-myc*, *Cdc6* und *β-Aktin* wurden mittels einer semiquantitativen RT-PCR mit verschiedenen cDNA-Mengen (1 und 3 µl) und Zyklenzahlen bestimmt. *β-Aktin* als nicht E2F-reguliertes Gen diente als interner Standard. Die cDNA wurde aus der Gesamt-RNA von asynchron wachsenden MEF generiert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurden parallel cDNA-Reaktionen ohne Reverse Transkriptase (ohne RT) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Die Daten aus dem DNA-Mikroarray mußten durch eine alternative Methode validiert werden. Da außerdem präparationsbedingte Unterschiede zwischen den MEF ausgeschlossen werden sollten, wurden für die Validierung neue MEF präpariert. Frau Frede hat die Expressionsanalyse eines Großteils der Gene mittels RPA und Northern-Hybridisierung wiederholt. Die Ergebnisse ihrer Arbeit seien hier mit freundlicher Genehmigung zusammengefasst: Es konnte eine Deregulation in EMA/E2F-6-defizienten Fibroblasten für einen überwiegenden Teil der Gene, die deutlich unterschiedlich exprimiert waren, bestätigt werden. Nicht gelungen ist dies allerdings für *PAI-1* und die meisten der nur gering deregulierten Gene. Ausnahmen hiervon waren *Dlk-1* (Delta-like 1, Homologes zu *Delta protein precursor* aus *Drosophila*) und *Growth arrest specific 2* (*Gas2*).

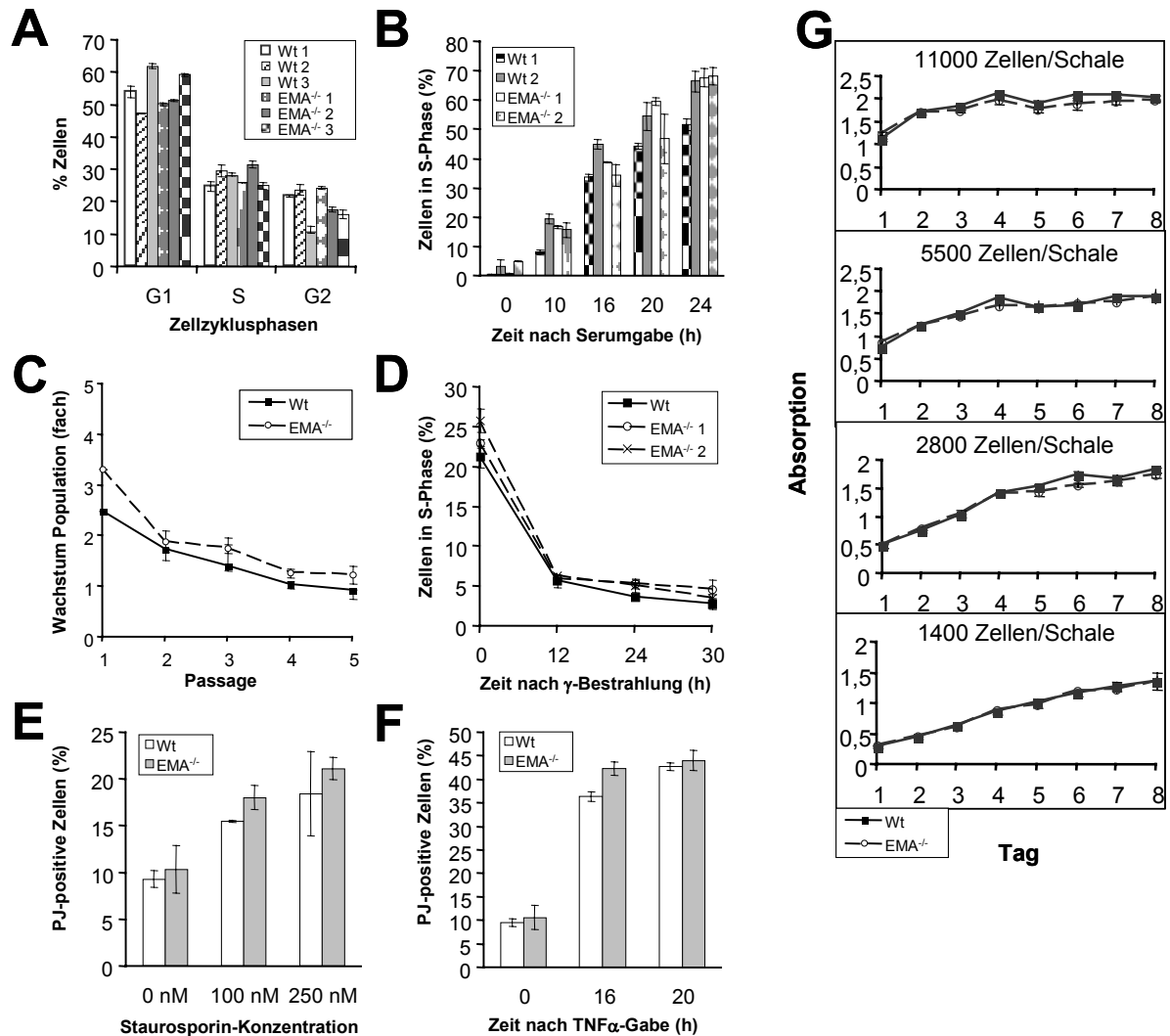


Abb. 28: **Eigenschaften von EMA/E2F-6-defizienten Fibroblasten.** Angegeben sind die Mittelwerte von je zwei bzw. drei parallelen MEF-Kulturen. (A) Verteilung der Zellzyklusphasen von mehreren unabhängig präparierten MEF. (B) Unabhängig präparierte MEF wurden durch Serumentzug synchronisiert und ihr Wiedereintritt in den Zellzyklus mittels BrdU-Einbau gemessen. (C) Das Wachstum der MEF wurde durch Ermitteln der relativen Zunahme der Zellzahl pro Passage bestimmt. (D) MEF wurden mit γ -Strahlen mit einer Einzeldosis von 5 Gy behandelt und der Anteil der Zellen, die in der S-Phase arretierten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mittels BrdU-Einbau bestimmt. (E) MEF wurden für die Apoptoseinduktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Staurosporin behandelt, ihre DNA mit Propidiumjodid gefärbt und die apoptotischen Zellen als Sub-G₁-Anteil an der Gesamtpopulation bestimmt. (F) Apoptose wurde auch durch die Gabe von TNF- α induziert. Der Anteil der apoptotischen Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde wie für Abb. (E) gemessen. (G) Die Proliferation unter verschiedenen Zelldichten wurde mit einer MTT-Analyse bestimmt. Dazu wurden die MEF täglich mit MTT versetzt und ihr Wachstum seit dem Ausplattieren indirekt über die Absorption des umgesetzten MTT bei einer Wellenlänge von 490 nm ermittelt.

3.5.2 EMA/E2F-6 ist für die Regulation klassischer E2F-Zielgene nicht notwendig

Es ist gezeigt worden, dass EMA/E2F-6 *in vivo* die Promotoren von E2F-Zielgenen wie *Cdc6*, *Thymidinkinase* und *E2F-1* bindet (Giangrande, et al., 2004; Ogawa, et al., 2002). Die DNA-Mikroarray-Analyse

hatte allerdings kein klassisches E2F-Zielgen in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF als dereguliert identifiziert. Daher wurde die Expression einiger E2F-Zielgene mittels semiquantitativer RT-PCR in asynchron wachsenden und in der G₀-Phase arretierten EMA/E2F-6^{-/-}- und Wildtyp-MEF verglichen. Für die semiquantitative PCR wurden verschiedene Anzahlen von Zyklen und verschiedene Mengen an cDNA eingesetzt. Auch mit dieser Analyse wurde keines der Gene in EMA/E2F-6-negativen Zellen deutlich dereguliert gefunden (Abb. 27 und Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend deuten die Daten an, dass EMA/E2F-6 für die Kontrolle klassischer E2F-Zielgene nicht notwendig ist

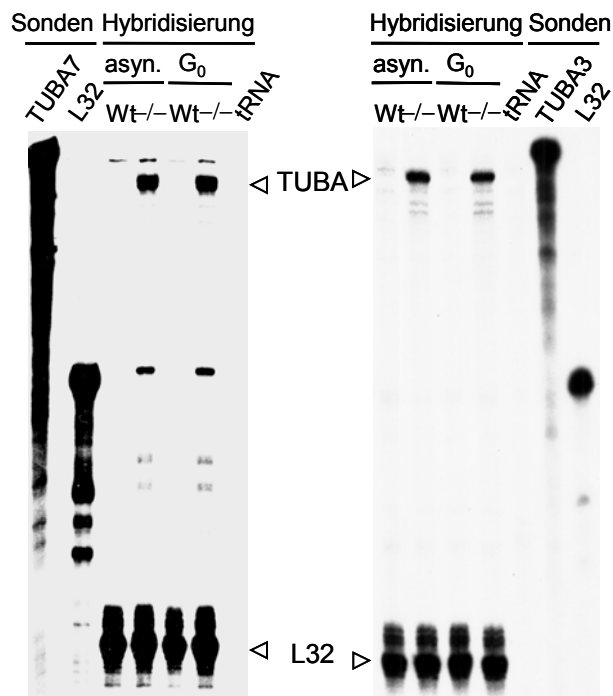


Abb. 29: Die Expressionen von TUBA7 und TUBA3 sind in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF induziert. RPA von TUBA7 (links) und TUBA3 (rechts). Dazu wurde Gesamt-RNA aus asynchron wachsenden (asyn.) und aus in G₀-arretierten (G₀) MEF analysiert. Die unbehandelten Sonden sind angegeben. L32 wurde als interner Standard eingesetzt. Die Hybridisierungsreaktion mit tRNA diente als Spezifitätskontrolle. (Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Frede zur Verfügung gestellt.)

Es stellte sich die Frage, ob EMA/E2F-6 auch für die Zellzykluskontrolle, DNA-Synthese, DNA-Reparatur und Apoptose, die durch die E2F-Familie reguliert werden, nicht limitierend ist. Dazu wurden diese Prozesse in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF analysiert (Abb. 28). In einigen Experimenten wurden die Fibroblasten eines Genotyps aus verschiedenen Embryonen, oft sogar aus verschiedenen Präparationen, parallel vermessen, um präparationsbedingte Effekte ausschließen zu können. Zuerst wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen per Durchflusszytometrie bestimmt. Sie war in Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-MEF gleich (Abb. 28 A). Weiter wurde das Verhalten der Fibroblasten nach Serumrestimulation untersucht (Abb. 28 B). Dazu wurde die Zellen, die nach der Serumzugabe in die S-Phase übergegangen waren, zu verschiedenen Zeitpunkten per BrdU-Einbau-Methode bestimmt. EMA/E2F-6^{-/-}-MEF waren mit der gleichen Kinetik wie die Kontrollzellen in die S-Phase eingetreten. Die Proliferation an sich war ebenfalls unverändert (Abb. 28 C und G). Sie wurde mit zwei verschiedenen Methoden gemessen: Einmal wurden die Fibroblasten aller drei Tage bei jeder Passagierung gezählt und der Faktor, um den die aktuelle Passage gegenüber der vorangegangenen Passage angewachsen war, errechnet (Abb. 28 C). Oder die Zellen wurden in verschiedenen Dichten ausplattiert, um ihre Dichte-abhängigen Proliferationseigenschaften

beobachten zu können. Die Proliferation wurde dann nach verschiedenen Tagen indirekt über die Umsetzung eines Substrats (MTT) bestimmt (Abb. 28 G). Ionisierende Strahlung erzeugt Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA. Um diese Schäden vor ihrer Teilung reparieren zu können, arretieren Zellen in der S-Phase. EMA/E2F-6^{-/-}-MEF arretierten nach einer γ -Bestrahlung in der S-Phase in gleichem Maße wie Wildtyp-MEF (Abb. 28 D). Zum Schluß wurde die Apoptoseinduktion untersucht. Sie war auf zwei Arten, die verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren, in den MEF ausgelöst worden: sowohl mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin (intrinsischer Weg, Mitochondrien-vermittelt) als auch mit dem Liganden des TNF-Rezeptors TNF α (extrinsisch, Rezeptor-vermittelt). Während der Apoptose wird die DNA der Zelle aktiv gespalten. Um die DNA mit Propidiumjodid färben zu können, muß vorher die Membran der Zellen und Zellkerne porös gemacht werden. In der Folge gegen kleine DNA-Spaltprodukte verloren und der zelluläre DNA-Gehalt erniedrigt sich. Diese Zellen können mit der Durchflusszytometrie als Sub-G₁-Anteil von den Zellen in anderen Zellzyklusphasen abgegrenzt werden. Der Anteil apoptotischer Zellen nach der Zugabe verschiedener Staurosporinmengen bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNF α -Gabe war in EMA/E2F-6^{-/-}- und Wildtyp-MEF gleich groß (Abb. 28 E und F). Gehen Zellen durch Nekrose zu Grunde, verringert sich allerdings auch ihr DNA-Gehalt. Obwohl die Referenzzellen (keine Staurosporin-Zugabe bzw. sofortige Ernte nach TNF α -Zugabe) in gleicher Weise wie die anderen Zellen behandelt worden waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Sub-G₁-Anteil nicht auch nekrotische Zellen repräsentierte. Aus diesem Grund wurden apoptotische Zellen in einen zweiten Experiment mit dem Caspaseinhibitor CaspACE FITC VAD-FMK (Promega) bestimmt. Da der Inhibitor VAD-FMK mehrere Apoptose-spezifischen Proteasen (Caspasen) bindet, kann er als spezifischer Apoptosenachweis dienen. Dieses Peptid ist mit der fluoreszierenden FITC-Gruppe gekoppelt, und so konnten die Zellen, die aktivierte Caspasen enthielten, ebenfalls mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Dieser Nachweis bestätigte bei beiden Induktionsmethoden das Ergebnis der vorangegangene Experimente (Daten nicht gezeigt). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass EMA/E2F-6 nicht für die Regulation von klassischen E2F-Zielgenen und in Übereinstimmung damit auch nicht für die Kontrolle von E2F-reguierten Zellzyklusprozessen benötigt wird.

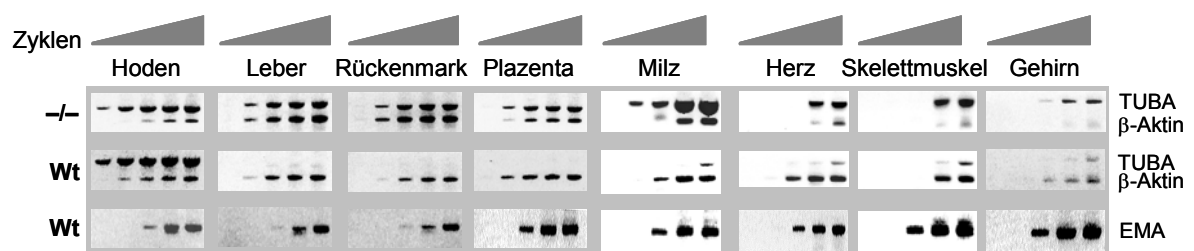


Abb. 30: **Der Verlust von EMA/E2F-6 führt zur Aufhebung der gewebspezifischen Repression der Gene *TUBA3* und *TUBA7*.** Semiquantitative RT-PCR mit verschiedenen Zyklusanzahlen (Zyklen) der TUBA3/7- (*TUBA*) bzw. der EMA/E2F-6- (*EMA*) Expression in EMA/E2F-6^{-/-} (-/-) und Wildtyp- (Wt) MEF. β -Aktin wurde als eine reaktionsinterne Kontrolle verwendet. (Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Frede zur Verfügung gestellt.)

3.5.3 Analyse der EMA/E2F-6-abhängigen Transkriptionsregulation der Gene *TUBA3* und *TUBA7*

Ein Ergebnis der DNA-Mikroarray-Analyse war, dass das *TUBA7*-Gen in asynchron wachsenden EMA/E2F-6^{-/-}-MEF stark aktiviert war. *TUBA7* ist ein spezieller α -Tubulin-Isotyp, der normalerweise nur im Hoden exprimiert wird (Villasante, et al., 1986). Der ebenfalls hodenspezifische Isotyp *TUBA3* ist auf Proteinebene mit *TUBA7* identisch, wird aber von einem eigenen Gen kodiert, das sich im kodierenden Bereich von *TUBA7* nur in einigen Kodons an der dritten Position unterscheidet (Villasante, et al., 1986). Die Expressionsunterschiede von *TUBA3* sowohl in asynchronen als auch in G₀-MEF und die *TUBA7*-Expression in G₀-MEF sind in der DNA-Mikroarray-Auswertung nicht erfasst worden, weil in diesen Fällen das normierte Signal der Wildtypzellen kleiner als der Schwellenwert von 500 war, d. h. es konnte keine Expression detektiert werden. Man kann zwar deshalb auch den jeweiligen Expressionsunterschied zwischen EMA/E2F-6^{-/-}- und Wildtyp-MEF nicht konkret angeben, aber *TUBA3* und *TUBA7* waren in EMA/E2F-6-defizienten asynchronen und G₀-MEF stark exprimiert. Im Gegensatz dazu waren die anderen α - und alle β -Tubuline, die auf dem DNA-Mikroarray repräsentiert waren (*TUBA1*, *TUBA4*, *TUBA6*, *TUBB2*, *TUBB4*, *TUBB5*), nicht unterschiedlich exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ein RPA von neu präparierten MEF konnte zudem verdeutlichen, dass die Expression von *TUBA3* und *TUBA7* (*TUBA3/7*) infolge des EMA/E2F-6-Verlusts in MEF induziert worden ist (Abb. 29). Die deregulierte Expression in MEF wies außerdem darauf hin, dass *TUBA3/7* generell die gewebespezifische Transkriptionskontrolle verloren haben könnte. Dieser Hypothese wurde mit einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse der *TUBA3/7*-Expression in verschiedenen Geweben EMA/E2F-6-defizienter Mäuse nachgegangen (Abb. 30). In all diesen Geweben war EMA/E2F-6 in Wildtyp-Mäusen exprimiert. Die PCR generierte von beiden *TUBA*-mRNA ein Produkt von identischer Größe. *TUBA3/7* wurde in allen Geweben nach EMA/E2F-6-Verlust exprimiert.

| | | | | | |
|--------------|--------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| | -446 | -436 | -426 | -416 | -406 |
| <i>TUBA3</i> | AGGCGAAAGG | AGGAAAGGCG | AGGACAGAGG | TACGGATAGT | GTGCAGGGCT |
| <i>TUBA7</i> | AGGTAA TACG | AGGCGA GGTG | AG-ACAT -GG | CA-GGATGGT | GGGGGAG-T |
| | -396 | -386 | -376 | -366 | -356 |
| <i>TUBA3</i> | GCTAGGGCAT | CCC TCCATCG | CCGATGCGCA | GATAACATAC | GCAGATAAGC |
| <i>TUBA7</i> | GCACAGCCGC | AAAGCCCTCC | CCAGGTCAAG | -----CA TGC | GCAGACCAGG |
| | -346 | -336 | -326 | -316 | -306 |
| <i>TUBA3</i> | AAGACTGAG | CGCCCCACTT | GTTCATGCT | AAGTTGGATG | TGGGGACGC |
| <i>TUBA7</i> | GAAGCTTGAG | CACCCCACTT | GTCTGCGCA | AAGCCGGATG | TCAGGGATGC |
| | -296 | -286 | -276 | -266 | -256 |
| <i>TUBA3</i> | GCAGACACAC | CTCCCCCAC | CCCCATTIT | CAGATGCTCC | TCAATGCTTG |
| <i>TUBA7</i> | GCAGAC - - - | - - - CTCCAGT | CTCCCGATCC | TAAG TTCTC - | ----- |
| | -246 | -236 | -216 | -216 | -156 |
| <i>TUBA3</i> | TCCCCCTCCA | GCCACTCCAG | AGCCTTCCCG | CCAAA GCCAC | ATCCAATCAG |
| <i>TUBA7</i> | T-CCCCCTCCA | GCCACTCCAG | AGCCTTCCCG | CCAAA TT TAC | ATCCAATCAG |
| | -196 | -186 | -176 | -176 | -156 |
| <i>TUBA3</i> | AAAGTGCCAG | CACTGCAACT | TGAGCCACAT | CCAATCATT | GTGG GATGTG |
| <i>TUBA7</i> | AAAGTACCAC | CGTTTCAAT | TGAGCCACAT | CCAATCGCA | AAAGGACGTG |
| | -146 | -136 | -126 | -116 | -107 |
| <i>TUBA3</i> | GAGCCTAAGG | CCGCCCTAA | GGCGCTCTGG | GCCAATGAGC | - CCGG CCT G |
| <i>TUBA7</i> | GCGCCTAAGC | CTGCCCTCA | GACGCTCTGG | ACTAATGAGC | ATCCAGGGAG |
| | -87 | -77 | -77 | -77 | -77 |
| <i>TUBA3</i> | GACTCCACAT | CCGTCTGGA | CTGT TGAGCG | CGCAGACC - - | ----- |
| <i>TUBA7</i> | AAAGCGTTAA | G TA-CCCGA | GCATCCAGCC | TG - -GACCGT | TGGGCGCACG |
| | -49 | -39 | -29 | -29 | -19 |
| <i>TUBA3</i> | AGAGGCGGTT | GAGGACCAGT | GGTGAGGAAC | GGCCGAGGCG | GCGTCTGAGC |
| <i>TUBA7</i> | AGCGGCGGTT | GAGGAGCAGC | TC TGAGGATC | GGCTGAGG - - | -----TG |
| | -9 | 2 | | | |
| <i>TUBA3</i> | GGGTCTCCGG | AGTTCAGC AT | G | | |
| <i>TUBA7</i> | CTCTGCTAGG | AGTTCAGC AT | G | | |

Abb. 31: Die Promotoren von *TUBA3* und *TUBA7* sind stark konserviert und enthalten eine E2F-Bindungsstelle.

Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF-Y und Myb. Die Pfeile geben die beiden unterschiedlich starken Transkriptionsstartpunkte des *TUBA3*-Promotors an. Das Translationsstartkodon ist fett gedruckt.

Eine Analyse der sehr ähnlichen *TUBA3/7*-Promotoren ergab, dass sie neben den konservierten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-Y (CCAAT-Box) und Myb eine identische potentielle E2F-Bindungsstelle enthalten (Abb. 31). Die Promotoren haben gerade in den die E2F-Bindungsstelle flankierenden Sequenzen eine hohe Homologie. Die E2F-Bindungsstelle ist außerdem in dem hodenspezifischen humanen *TUBA3/7*-homologen Gen *TUBA2* (Dode, et al., 1998) und anderen humanen Homologen, die in der NCBI-Datenbank identifiziert werden konnten, sowie in zwei *TUBA3/7*-Homologen aus Primaten identisch (Abb. 32).

Um die Rolle der E2F-Bindungsstelle in der EMA/E2F-6-abhängigen Kontrolle der *TUBA3/7*-Expression zu bestimmen, wurde als erstes untersucht, ob EMA/E2F-6 an diese Stelle bindet. Dazu wurde ein 66 Nukleotide-langes Fragment aus dem *TUBA7*-Promotor mit der E2F-Bindungsstelle in der Mitte als Sonde für Gelretardationsexperimente ausgewählt. In diesen Experimenten werden DNA-Proteinkomplexe in einem Acrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und durch radioaktive Markierung der DNA-Sonde detektiert. In Abhängigkeit von der Mutation der E2F-Bindungsstelle konnten verschiedene DNA-Protein-Komplexe mit zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten aus HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 33 A). Weiter konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Hämagglutinin (HA)-gekoppeltes EMA/E2F-6 (Pfeilkopf in Abb. 33 B) und E2F-4 zusammen mit rekombinantem DP-1 die Wildtyp-Bindungsstelle aber nicht die mutierte Bindungsstelle binden. Dass es sich bei dem zusätzlichen, starken Signal um einen rekombinanten EMA/E2F-6-enthaltenden Komplex handelte, wurde damit unterstützt, dass sich das Laufverhalten des Komplexes nach Koinkubation mit einem HA-Antikörper verändert hatte („Supershift“) (Abb. 33 B). Mit dem Einsatz von Antikörpern gegen E2F-4 und DP-1 konnten in zytoplasmatischen und nukleären HeLa-Extrakten an der E2F-Bindungsstelle auch endogene E2F-4/DP-1-Komplexe nachgewiesen werden (Abb. 33 C). Da nach Koinkubation mit einem E2F-4-Antikörper sich die Laufeigenschaften nur eines Teil der Komplexe (Spuren 3 und 5) aber nach Koinkubation mit einem DP-1-Antikörper sich die Laufeigenschaften aller Komplexe (Spuren 3 und 6) an der E2F-Bindungsstelle änderten, scheinen dort neben E2F-4/DP-1 weitere E2F/DP-1-Komplexe gebunden zu haben. Es ist es andererseits nicht gelungen, eine Interaktion von endogenem EMA/E2F-6 mit dem *TUBA7*-Promotor nachzuweisen. So hatten sich die Bandenmuster aus Extrakten aus Wildtyp- und EMA/E2F-6^{-/-}-MEF nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass an der konservierten E2F-Bindungsstelle im *TUBA7*-Promotor Komplexe mit rekombinanten EMA/E2F-6/DP-1 und andere endogene E2F/DP-Komplexe nachgewiesen werden konnten.

| | |
|------------------------------|--|
| | 1-----10-----20-----30-----40-----50 |
| hTUBAH2 | CTGGGAGCAAGGCAATGTTCCGCGACCCACAGAGGCAGCGCAGTAGCTGT |
| hTUBA-ähnlich | CTGGGAGCAAGGCAATGTTCCGCGACCCACAGAGGCAGCGCAGTAGCTGT |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | CTGGTAGCAAGGCAATGTTCCCGACCCACAGAGGCAGCGCAGTAGCTGT |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | CTGGGAGCAAGGCAGTGTTCGCGACCCACAAAAGCCGTGCAGTAGCTGT |
| hTUBA2 | CTTACA--AA-GCAATGTTCCCTCCACCTATAAAG--A-CGCAGTAGCTGC |
| mTUBA3 | CCTGAGCGCCCACTTGTTCATGCTAAGTTGGATGTCGGGGACGCGCAG |
| mTUBA7 | CTTGAGCACCCTTGT-CCTGCGCAAAGCCGGATGTCAGGGATGCGCA |
| hTUBAH2 | TCCAACCCT-GGTCAGAAGACACCCCGAAATGCCTCAGCAACCGCGCAG |
| hTUBA-ähnlich | TCCAATCCT-GGTCGGAAGACACCCCGAAATGCCTCAGCAACCGCGCAG |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | TCCAACCCT-GGTCAGAAGACACCCCGAAATGCCTCAGCAACCGCGCAG |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | TCCAATCCC-GGTCAGAAGACGCCCCGAAATGCCTCAGCACCCGCCAAG |
| hTUBA2 | TCCA-TCCCCGGTCAGA-GGACCCCGGAAACGTCTCAGC--CCACGCAC |
| mTUBA3 | ACACACCTCCCCCACCCTCATTTTCAGATGCTCCTCAATGCTTGTTC |
| mTUBA7 | -----GACCTCAGTCTCCGATCCTAAGTTCTCTCC |
| hTUBAH2 | ----- |
| hTUBA-ähnlich | ----- |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | ----- |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | ----- |
| hTUBA2 | TGCCCCCTGACCCCACTGCCTTCCCGCCAATCCTGCATCCAAGT CAGAGG |
| mTUBA3 | ----- |
| mTUBA7 | ----- |
| hTUBAH2 | CCTTTGATGACCCGCTGCCTTCCCGCCAATCCTTACATCCAATCAGAGAG |
| hTUBA-ähnlich | CCTTTGATGACCCGCTGCCTTCCCGCCAATCCTGCATCCAATCAGAGAG |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | CCTTTGATGACCCGCTGCCTTCCCGCCAATCCTTACATCCAATCAGAGAG |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | CCTTTCTGACCCGCTGCTTTCCCGCCAATCCTGCATCCAATCAGAGAG |
| hTUBA2 | CCCTCTCTGAGCTGCTGCCTTCCCGCCAATCCTGCATCCAATCAGAGG |
| mTUBA3 | CCTCCAGCCACTCCAGAGCCTTCCCGCCAAGCCACATCCAATCAGAAAG |
| mTUBA7 | CCTCCAGCCACTCCAGAGCCTTCCCGCCAATTTACATCCAATCAGAAAG |
| hTUBAH2 | CGTCCCAGTACACATGTTGAGCAATGGCCAATCAGAACTGGGATCCGGC |
| hTUBA-ähnlich | CATCCCCACTACACGCTGTTGAGCAACGGCCAATCAGAACTGGGATCCGGC |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | CGTCCCAGTACACATGTTGAGCAATGGCCAATCAGAACTGGGATCCAGC |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | CGTCCCCACTTACGCTGTTGAGCAATGGCCAATCAGAACTGGGACCCGGC |
| hTUBA2 | CGTCCCCACTACGTGTTTGCACAAACGGCCAATCAAACCTAGGATCCGAG |
| mTUBA3 | --TGCCAGCACTGCAACTTGAGCCACATCCAATCATTAGTGGGATGTGGA |
| mTUBA7 | --TACCACCGCTTCAAATTGAGCCACATCCAATCGCAAAAGGACGTGGC |
| hTUBAH2 | -CCTCAGCCCGCCTCCAGGAATCCGAGCCAATGGCGGCTGGCACCGG |
| hTUBA-ähnlich | -CCTCGGCTGCTCCAGGAATCCGAGCCAATGGCGGCTGGCACCGG |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | -CCTCAGCCCGCCTCCAGGATCTCCAGGCCAATGGCGGCTGGCACCGG |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | -CTTCGCGCCGCTCCAGGAATCCAGGCCAATGGCAGCTGGCAGCGG |
| hTUBA2 | -CCTTGCGCCGCTCCAGGACGTCCGGACCAATGGTGGCTGGCACCG |
| mTUBA3 | GCCTAAGGCGCGCCTAAGGCGCTCTGGGCCAATGAGCCCGGCTGGAC |
| mTUBA7 | GCCTAAGCCTGCCCGGAGACGCTCTGGACTAATGAGCATCAGGGAGAA |
| hTUBAH2 | CGGGCCAATCCCGTGGCGCGCGCACAGGCAGGAGGTTGCAAGTTGGGCGCT |
| hTUBA-ähnlich | CAGGCCAATCCTGTGCGGCGCGCTGGGAGGTCATTGCAAGTTGGGCGCT |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | CGGGCCAATCCCGTGGCAGCGCGCACGGGCAGGAGGTTGCAAGTTGGGCGCT |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | CGGGCCAATCCCGTGGCAGCGCGCGGGGCAGAGGTTGCAAGTTGGGCGCT |
| hTUBA2 | CAGGCCAATCCAGACAGCGCACGGCGGGAGGC---TGTCGTTGGGCGTG |
| mTUBA3 | TCCAC--ATCCGCTCTGGACT-----GTTGAGCGCG |
| mTUBA7 | AGCGTTAAGTACCCGAGCATCCAGCCTGGACC-----GTTGGGCGCA |
| hTUBAH2 | CAGCAGCTGTGGCAGCGGGTTGAGGCTTGGCAGTAGCCTTGGGCTGAAGC |
| hTUBA-ähnlich | CAGCAGCTGTGGCAGCGGGTTGAGGCTTGGAAAGTAGCCTTGGGCTGAAGC |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | CAGCAGCTGTGGCAGCGGGTTGAGGCTTGGAAAGTAGCCTTGGGCTGAAGC |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | CAGCAGCTGTGGCAGCGGGTTGAGGCTTGGAAAGTAGCCTTGGGCTGAAGC |
| hTUBA2 | C-GCAGCTGCAGC-GGCGGTTGAGGCTAAGTAGTAGCCTTGGGCTGCGGC |
| mTUBA3 | C-----AGACCAGAGGCGGTTGAGGACAGTGGTGAGGAACGGCCAGGC |
| mTUBA7 | C-----GAGCGGCGGTTGAGGAGCAGCTCTGAGGATCGGCTGAGGT |
| hTUBAH2 | -----AGCGGAGTTCGCCATGCTAAGGCCGGGTCACTC |
| hTUBA-ähnlich | -----AGCGGAGTTCGCCATGCTAAGGCCGGGTCACTC |
| P. troglodytes TUBA2-ähnlich | -----AGCGGAGTTCGCCATGCTAAGGCCGGGTCACTC |
| P. anubis TUBA2-ähnlich | -----GGCGGAGTTCGCTATGCTAAGACCCGGGCTCCTTC |
| hTUBA2 | -----AGCGGAGGAGCTCAACATGCTAAGGCCAGGTCACCTCC |
| mTUBA3 | GGCGTCTGAGCGGCTCTCCGGAGTTCAGCATGCTGAGAGCGG |
| mTUBA7 | -----GCTCTGCTAGGAGTTCAGCATGCTGAGAACAGCCGAACC |

Abb. 32: Das E2F-Element ist in den Promotoren von TUBA3/7-Homologen des Menschen und zweier Primatenarten identisch. Homologe Gene von TUBA3/7 wurden in der NCBI-Datenbank im Genom des Menschen und zweier Primatenarten gefunden (Zugangsnummern: *Homo sapiens* α -Tubulin-Isotyp H2 – XM_054284 und AK093116; *Homo sapiens* α -Tubulin-ähnlich – XM_053177 und AK131043; *Pan troglodytes* TUBA2-ähnlich – AC120782; *Papio anubis* TUBA2-ähnlich – AC113266; hTUBA2 – AL139327). Angegeben sind ca. 220 bp oberhalb des Translationsstartkodons (fett gedruckt). Farblich hinterlegt sind die zwischen den Spezies identischen DNA-Bindungssequenzen von E2F (türkis), NF-Y (gelb) und Myb (pink). Grau hinterlegt sind weitere konservierte Nukleotide.

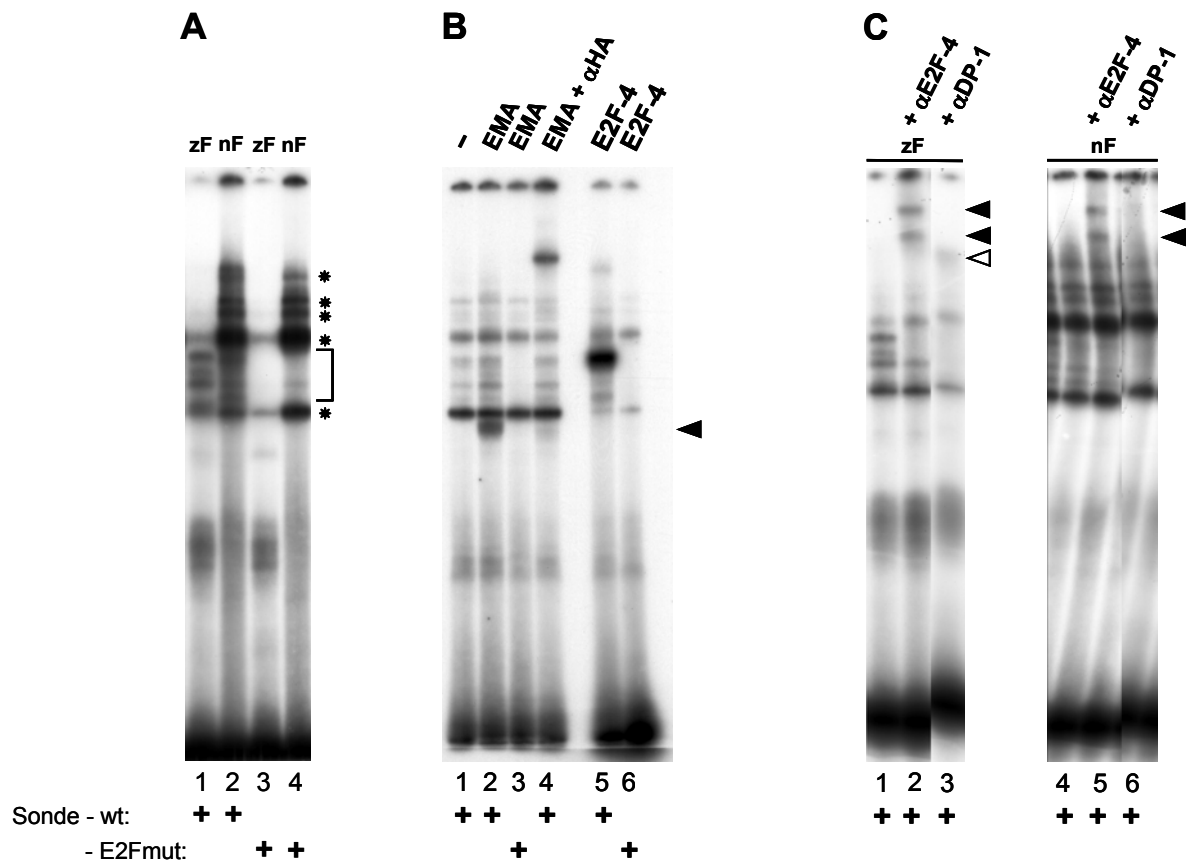


Abb. 33: **EMA/E2F-6/DP-Komplexe und andere E2F/DP-Komplexe binden an das E2F DNA-Element im *TUBA7*-Promotor.** Gelretardationsexperimente mit Extrakten aus HeLa-Zellen. Als DNA-Sonde diente ein Fragment aus dem *TUBA7*-Promotor mit der E2F-Bindungsstelle in der Mitte (Sonde-wt) bzw. mit der mutierten E2F-Bindungsstelle (Sonde-E2Fmut, TTCCCGCCAA→TTCTTAACAA). (A) In Abhängigkeit vom E2F-Element hatten verschiedenen Faktoren aus der zytoplasmatischen (zF) und der nukleären Fraktion (nF) an die Sonde gebunden (Klammer). Sternchen, unabhängige Komplexe. (B) Die Zellen wurden transient transfiziert mit Expressionsplasmiden für DP-1 alleine (Spur 1) oder zusammen mit Hämagglutinin-gekoppelten (HA) EMA/E2F-6 (Spuren 2 - 4) bzw. mit E2F-4 (Spuren 5, 6) und Ganzzelextrakte daraus präpariert. Zusätzlich war ein HA-spezifischer Antikörper zu der Bindungsreaktion gegeben worden (Spur 4). (C) Die Zugabe von spezifischen Antikörpern führte zu α E2F-4-abhängigen (volle Pfeilköpfe) bzw. zu α DP-1-abhängigen (leerer Pfeilkopf) Komplexretardationen.

E2F-Bindungsstellen können positive und negative Regulatorelemente sein. Da EMA/E2F-6 ein Repressor ist, sollten jene E2F-Bindungsstellen, die von EMA/E2F-6 gebunden werden, als negative Kontrollelemente die Repression der Promotoraktivität bewirken. Um diese Hypothese zu testen, wurde die E2F-Bindungsstelle im *TUBA3*-Promotor mit Reportergen-Assays analysiert. In einem Reportergen-Assay fungiert das zu untersuchende Promotorfragment als künstlicher Promotor für die Transkription eines Enzyms, dessen Aktivität leicht messbar ist. Ca. 700 bp des *TUBA3*-Promotors wurden in den Reportervektor pGL3-Basic kloniert und die E2F-Bindungsstelle punktmuiert oder deletiert (siehe Kapitel 2.4.7). In pGL3-Basic ist das Reportergen die aus dem Glühwürmchen stammende *Luciferase*, deren Expression indirekt über die Menge des emittierten Lichts aus der Oxidation von zugegebenem Luciferin gemessen wird. Die transiente Transfektion dieser Vektoren in HeLa-Zellen ergab, dass die Mutation der E2F-Bindungsstelle des *TUBA3*-Promotors zu einer zweifachen Derepression der Promotoraktivität führte (Abb. 34 A). Dieser Anstieg war nicht auf die Generierung eines aktivierenden

Kontrollelement infolge der Mutation zurückzuführen, da die Deletion der E2F-Bindungsstelle zu dem gleichen Effekt führte. In Wildtyp-MEF war die Derepression infolge der Mutation der E2F-Bindungsstelle sogar acht-fach (Abb. 34 B). In Übereinstimmung damit führte der Verlust von EMA/E2F-6 ebenfalls zu eine Aktivitätssteigerung, da der Wildtyp-Promotor in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF zweimal so aktiv wie in Wildtyp-MEF war. Bemerkenswerterweise führte die Mutation der E2F-Bindungsstelle in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF auch zu einem Anstieg der Promotoraktivität. Daraus resultiert, dass die E2F-Bindungsstelle des TUBA3-Promotors ein negatives Kontrollelement ist und dieses Element EMA/E2F-6-abhängig reguliert werden kann.

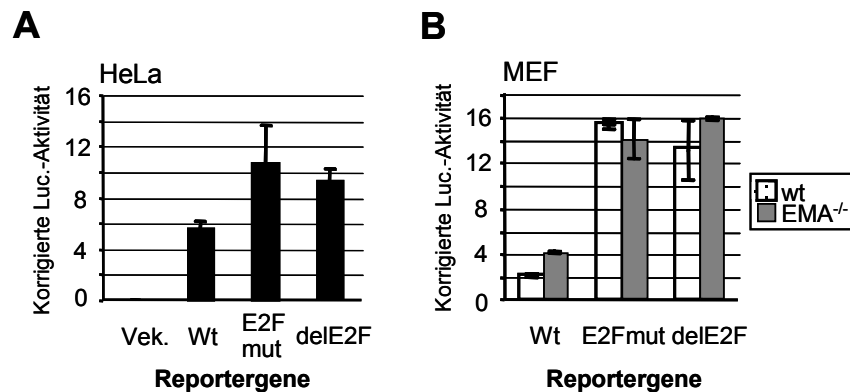


Abb. 34: **Die E2F DNA-Bindungsstelle im TUBA3-Promotor ist ein reprimierendes Element und wirkt EMA/E2F-6-abhängig.** Transiente Transfektionen (A) in HeLa-Zellen oder (B) in Wildtyp- (wt) und in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF (EMA^{-/-}) von Luciferase-Reporengenvektoren des Wildtyp-TUBA3-Promotors (Wt) und des TUBA3-Promotors mit punktmutierter (E2Fmut) bzw. mit deletierter E2F-Bindungsstelle (delE2F). Die Luciferaseaktivität (Luc.-Aktivität) wurde mit der Aktivität eines kotransfizierten RSV-β-Gal-Vektors zur Berücksichtigung der relativen Transfektionseffizienz korrigiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei parallelen Transfektionen eines repräsentativen Experiments.

4 Diskussion

EMA/E2F-6 wurde als ein Mitglied der E2F-Familie identifiziert, da es eine zu den bereits bekannten E2F-1 bis E2F-5 homologe DNA-Bindungsdomäne besitzt und ebenfalls als Heterodimer mit DP DNA bindet. EMA/E2F-6 ist an der Kontrolle von E2F-regulierten Genen in verschiedenen Zellzyklusphasen beteiligt. Dennoch hat EMA/E2F-6 innerhalb der E2F-Familie eine eigenständige Position, weil es im Gegensatz zu E2F-1 bis E2F-5 nicht mit den Pocketproteinen wechselwirkt und anstatt dessen im Komplex mit Pc-G-Proteinen und Chromatin-modifizierenden Proteinen als Repressor wirkt. In der vorliegenden Arbeit wurden EMA/E2F-6-defiziente Mäuse generiert, um die Funktionen von EMA/E2F-6 *in vivo* aufzuklären. Diese Mäuse leiden im Alter an Lähmungen der Beine. Es konnte gezeigt werden, dass die Ursache dafür wahrscheinlich eine EMA/E2F-6-abhängige Funktion bei der Erhaltung der Myelinscheide der Axone zentraler und peripherer Nerven ist. Außerdem ist EMA/E2F-6 für die Repression von männlichen Keimbahngenen in somatischen Zellen notwendig. Solche Gene wie *TUBA3* und *TUBA7* sind in EMA/E2F-6-negativen Mäusen in allen Organen exprimiert. Im Gegensatz dazu ist EMA/E2F-6 für die Kontrolle klassischer E2F-regulierter Gene nicht essentiell. In Übereinstimmung damit waren die zellulären Prozesse, die über diese Gene von E2F reguliert werden, in primären EMA/E2F-6-negativen Fibroblasten unverändert. Die Analyse der spontanen Tumore in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen demonstrierte, dass EMA/E2F-6 keinen Einfluss auf die Entwicklung von malignen Tumoren hat. Weiter konnte in den Mäusen beobachtet werden, dass EMA/E2F-6 nur für bestimmte Pc-G-Protein-abhängige Funktionen notwendig ist.

4.1 EMA/E2F-6 hat eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Myelinschichten

EMA/E2F-6-defiziente Mäuse hatten die gleiche Lebenserwartung wie ihre Wildtypgeschwister; sie erkrankten jedoch spät an einer Demyelinisierung der Axone im zentralen und peripheren Nervensystem. Der Demyelinisierung folgte das Absterben der Axone, die besonders in der weißen Substanz des Rückenmarks betroffen waren. Zeitlich konnten die Schäden im Rückenmark als die ältesten eingeordnet werden. Außerdem war die Menge der myelinisierenden Zellen des ZNS, der Oligodendrozyten, reduziert. Es ist anzunehmen, dass der Verlust der Oligodendrozyten mit der Demyelinisierung in einem engen Zusammenhang steht. Die Krankheit äußerte sich anfänglich in einer Funktionseinschränkung der Hinterbeine, einer Paraparese. Später waren auch die Vorderbeine betroffen, und die Hinterbeine waren zunehmend gelähmt. Obwohl alle der untersuchten EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse die pathologischen Veränderungen hatten, äußerte nur ein Viertel von ihnen Lähmungssymptome. Alle neurodegenerativen Erkrankungen haben typischerweise eine initiale Phase des Untergangs des betroffenen Zelltyps ohne symptomatische Anzeichen. So können Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose oder mit dem Parkinson-Syndrom 50 - 80 % der Zielneurone verloren haben, bevor sich neurologische Symptome äußern (Bradley, 1987; Lloyd, 1977). Wahrscheinlich verstarben die nichtsymptomatischen EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse vor dem Auftreten der Ausfallserscheinungen, da die Erkrankung der EMA/E2F-6-mutierten Mäuse erst spät einsetzte.

Die Myelinscheide ist eine multilamellare Struktur, die Axonsegmente umhüllt und so das Axon gegen einen Einstrom von Natriumionen isoliert – sie schirmt das Axon elektrisch ab. Eine intakte Myelinscheide ist zusammen mit den Ranvierschen Schnürringen die Voraussetzung für eine schnelle Weiterleitung des elektrischen Impulses (saltatorische Erregungsleitung) besonders in langen Axonen, wie sie in den Pyramidenbahnen

des Rückenmarks vorkommen. In unmyelinisierten Axonen beträgt die Geschwindigkeit der Leitung des elektrischen Impulses maximal nur ein Zehntel der Geschwindigkeit, die in myelinisierten Axonen gemessen werden kann. Die Ranvierschen Schnürringe dienen außerdem noch als Verstärkerstationen des elektrischen Impulses. Eine wiederholte Verstärkung ist in langen Axonen auch notwendig, um ein Versiegen des Impulses zu verhindern. So ist es leicht vorstellbar, dass demyelinisierte Axone die Leitung eines Signals signifikant hemmen. Eine Maus ist bereits völlig gelähmt, wenn 40 % ihrer Motoneuronen untergegangen sind (Monani, et al., 2000). Das veränderte Nervengewebe der EMA/E2F-6-defizienten Mäuse wurde von Makrophagen infiltriert, die einen Abräumungsprozess der geschädigten Zellen in Gang setzten. Diese massiven Zerstörungen sind möglicherweise die Ursache für den ab einem Zeitpunkt sehr progressiven Charakter der Degeneration. Einzelne untergegangene Neurone haben nicht so gravierenden Auswirkungen, dass die Mäuse nicht mehr laufen können, sondern ihr Ausfall kann zum Teil auch durch intakte Neurone kompensiert werden (Bjartmar, et al., 1999). Da aber ganze Nervenfasernstränge in den EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen durch lokale Läsionen in verschiedenen Ebenen der kranio-kaudalen Achse geschädigt waren, ist es zu einer mehrfachen Unterbrechung der Nervenleitung gekommen, die letztendlich zum vollständigen Funktionsverlust geführt haben könnte.

Da EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse den neurologischen Defekt erst spät zeigten, wurden EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse anfänglich nicht bis zu ihrem natürlichen Lebensende gehalten. Als die ersten Mäuse mit der neurodegenerativen Erkrankung auftraten, wurden auch ihre heterozygoten Geschwister weiter gehalten, um untersuchen zu können, ob bereits ein inaktives *EMA/E2F-6*-Allel für die Degeneration ausreicht. Aus diesen Gründen gibt es zwar im Moment nur wenige EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse mit dem Alter, in dem die Erkrankung bei ihren homozygoten Geschwistern auftrat, aber unter ihnen waren in der Tat bereits einige, die Lähmungssymptome mit den entsprechenden pathologischen Veränderungen hatten. Die Beobachtung des Verhaltens der Mäuse und erste histologischen Analysen deuten an, dass die Erkrankung hier einen weniger progressiven Verlauf nimmt. Dass bedeutet, dass EMA/E2F-6 in diesem Prozess konzentrationsabhängig zu wirken scheint. Die Abwesenheit eines Transkriptionsfaktors schlägt sich letztendlich in der Deregulation seiner Zielgene nieder. Offenbar reicht nur ein Teil der physiologischen EMA/E2F-6-Menge nicht aus, um das oder die in diesem Prozess relevante(n) Zielgen(e) adäquat zu reprimieren. Eine Erkrankung heterozygoter Mäuse ist auch für eine Übertragung der Befunde aus der Maus zu einer Krankheit des Menschen von Relevanz. In der Regel ist bei erblich bedingten Krankheiten ein Allel mutiert, da die Wahrscheinlichkeit der spontanen Mutation des zweiten Allels gering ist. Es ist daher erwägenswert, Patienten, die den EMA/E2F-6-defizienten Mäusen ähnliche Lähmungssymptome haben und/oder bei denen mittels Magnetresonanztomographie ähnliche Schäden des Nervensystems festgestellt wurden und der Krankheit noch keine Ursache zugeordnet werden konnte, auf erniedrigte EMA/E2F-6-Expression oder eine Mutation des EMA/E2F-6-Gen zu untersuchen. Antikörper gegen endogenes humanes EMA/E2F-6 werden kommerziell vertrieben. Die Kenntnis der molekularen Ursache einer Krankheit wäre ein wesentlicher Schritt zu ihrem Verständnis und damit möglicherweise zu einem Therapieansatz.

Die pathologischen Veränderungen und die Symptomatik der Ausfallserscheinungen konnten einer konkreten Erkrankung des Menschen nicht eindeutig zugeordnet werden (F. van Landeghem, A. von Deimling, persönliche Mitteilung). Das Erscheinungsbild der Demyelinisierung und die infiltrierten Makrophagen in der weißen Substanz des ZNS haben Ähnlichkeit mit Befunden, wie man sie bei Multipler Sklerose antrifft. Es konnten aber keine T-Zellen, die das charakteristische Merkmal einer Multiplen Sklerose sind und sich morphologisch deutlich von Makrophagen unterscheiden lassen, im Nervengewebe der EMA/E2F-6-defizienten Mäusen gefunden werden [zusammengefasst von (Hafler, 2004)]. Klar abgrenzen von Multipler Sklerose lassen sich

außerdem die Befunde in dem peripheren Nerven *Nervus ischiadicus*, da Multiple Sklerose auf das ZNS beschränkt ist (Hafler, 2004). Bei 85 - 90% der Patienten verläuft Multiple Sklerose schubförmig mit teilweise kompletter Rückbildung der Symptome (*relapsing-remitting MS*). Akute Krankheitsattacken und derartige Rückbildungen wurden bei EMA/E2F-6-defizienten Mäusen nie beobachtet sondern vielmehr ein gradueller Verfall. Ähnlichkeit hat die Erkrankung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse auch mit einer akuten demyelinisierenden Enzephalomyelitis (ADEM), die klinisch und mittels bildgebender Verfahren nicht von einer akuten Multiple Sklerose-Attacke unterscheidbar ist [zusammengefasst von (Garg, 2003)]. Vergleichbar mit einer ADEM sind im Besonderen der monophasische Verlauf und die schnelle Entwicklung beider Erkrankungen und dass der Schwerpunkt zwar im ZNS ist, aber das PNS auch betroffen ist. Abweichend ist, dass ADEM-spezifische Veränderungen Hyperämie (Blutüberfüllung eines Organs), endotheliale Schwellungen und Hämorrhagie (Blutung) sind. ADEM ist typischerweise bei Kindern zu finden und wird durch Infektionen oder eine Schutzimpfung verursacht, die wahrscheinlich eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion gegen das Myelinprotein MBP auslösen. Vergleichbar sind ebenfalls hereditäre spastische Paraplegien [zusammengefasst von (Reid, 2003)]. In diesen Fällen sind die Pyramidenbahnen des ZNS durch Minderentwicklung oder Degeneration betroffen, die zu einer fortschreitenden Lähmung der Hinterbeine führen. Die bekannteste Form ist die Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PDM), die sich infolge Genmutationen (bemerkenswerterweise auch Genduplikationen, die einen Dosisseffekt verursachen) des Myelinproteins PLP entwickelt. Interessant bei dieser Gruppe von Neurodegenerationen – inzwischen sind mehr als 20 eigenständige Formen beschrieben worden - ist außerdem, dass jeweils nur ein mutiertes Gen zum Krankheitsausbruch beiträgt (Monogenie). Obwohl die eigentliche Ursache noch unbekannt ist, vermutet man dagegen bei der Multiplen Sklerose, dass mehrere Einflüsse (auch exogene) zur Erkrankung führen (Hafler, 2004). Die Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit wird andererseits auch den Leukoenzephalopathien (Leukodystrophien) zugeordnet. Leukoenzephalopathien werden heute als vererbare Myelindefekte mit unterschiedlicher molekularer Ursache aber ohne Entzündungsmerkmale definiert (Kaye, 2001). Deshalb kann die neurodegenerative Erkrankung der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse am ehesten der hypomyelinisierenden Form der Leukoenzephalopathie zugeordnet werden.

Die wichtigste Frage ist, die Expression welches Zielgen bzw. welcher Signalweg durch den Verlust von EMA/E2F-6 beeinträchtigt wird und so die Schädigung des Nervensystems bewirkt. Die Expressionshöhe dieses Faktors könnte dann auch in Patienten bestimmt werden. Um Kandidaten für einen solchen Faktor zu identifizieren, kann man die Expressionsprofile von neuronalen Zelltypen oder auch von präparierten Geweben von mutierten und Wildtyp-Mäusen vergleichen. Die Expressionsprofile von MEF sind im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich verglichen worden. Es hatte sich herausgestellt, dass die Expression der α -Tubuline TUBA3/7 nicht nur in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF sondern auch in EMA/E2F-6^{-/-}-Gewebe stark erhöht ist. Die Mikrotubulinuntereinheit Tubulin als wichtige Zytoskelettkomponente wurde in der Literatur bereits in Zusammenhang mit Funktionen des Nervensystems sowie mit neurodegenerativen und motorneuronalen Erkrankungen beschrieben. So ist bekannt, dass Mikrotubuli die Stabilität der oligodentrogialen Fortsätze bestimmen. Dieser Aspekt ist besonders bemerkenswert, da in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen die Oligodendrozyten reduziert sind. Weiter gibt es zunehmende Hinweise, dass das Mikrotubuli-Netzwerk der Oligodendrozyten wichtige Transportaufgaben für Myelin Komponenten bzw. deren mRNA hat (Ainger, et al., 1993; Larocca and Rodriguez-Gabin, 2002). Außerdem transportieren Mikrotubuli Zellorganellen und Zytoskelettproteine vor- und rückwärtsgerichtet (Ishihara, et al., 1999). Mäuse mit einer progressiven Motorneuropathie (*pmn*) sind ein Tiermodell für motorneuronale Erkrankungen des Menschen wie der spinalen Muskelatrophie. Bei diesen Mäusen konnte die

frühe Lähmung der Hinterbeine auf eine fortschreitende Axondegeneration im Rückenmark und in den peripheren Nerven (ohne Myelinisierungsschaden) zurückgeführt werden (Schmalbruch, et al., 1991). Die *pmn*-Mutation muß beide Allele betreffen und wurde als Aminosäuresubstitution, die aus einer Punktmutation resultiert, des Tubulin-spezifischen Chaperons E (Tbce) identifiziert (Bömmel, et al., 2002; Martin, et al., 2002). Tbce ist ein für die Bildung der primären α - und β -Tubulin-Heterodimerkomplexe notwendiger Kofaktor. Die Substitution bewirkt eine verringerte Proteinstabilität. Amyotrophische Lateralsklerose (ALS) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des ersten und zweiten Motorneurons im fortgeschrittenen Erwachsenenalter, die zur Lähmung und schließlich zum Tod führt. Mutationen des die Superoxyddismutase 1 kodierenden Gens *SOD1* betreffen 20 % der familiären ALS-Fälle. In *SOD1*-mutierten Mäusen ist eine Anhäufung von Tubulin in den Perikarien und proximalen Axonsegmenten von spinalen Motorneuronen beobachtet worden (Williamson and Cleveland, 1999). Diese Abnormalitäten konnten mit einer Verlangsamung des axonalen Transportes in diesen Mäusen in Zusammenhang gebracht werden (Williamson and Cleveland, 1999). Die *taiep*-Ratte ist eine Rattenlinie mit einem Defekt in der Myelinsynthese und -erhaltung im ZNS. Die Tiere leiden an Ataxie und Zittern. Interessanterweise haben ältere *taiep*-Ratten eine Parese der Hinterextremitäten bis hin zur Lähmung. Die Grundlage des Defekts ist eine Mikrotubuliakkumulation in den Oligodendrozyten und infolge dessen eine Aneinanderlagerung der Mikrotubuli (Song, et al., 1999). Die Autoren diskutieren, dass eine spezifische Isoform des Tubulins in den Oligodendrozyten fehlexprimiert wird und dass diese Fehlexpression durch eine veränderte Promotoraktivität hervorgerufen werden könnte. Ein Anstieg der $\beta 2$ und $\beta 3$ -Tubulinisoformen wurde bei der am stärksten von Demyelinisierung betroffenen Form Typ 1 der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT1) beobachtet (Watson, et al., 1994). Die Integrität und die Quantität der axonalen Mikrotubuli der EMA/E2F-6-defizienten Mäuse ist mittels Elektronenmikroskopie untersucht worden, aber es wurde kein Unterschied zu Kontrollaufnahmen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann die Feinstruktur der Mikrotubuli erst bei sehr hohen Vergrößerungen (100.000 – 130.000x), die in der durchgeführten Analyse nicht erreicht worden sind, genau beurteilt werden. Außerdem sollten auch die Mikrotubuli von Oligodendrozyten und Schwannzellen untersucht werden. Daher ist diesbezüglich noch keine endgültige Aussage möglich. In diesem Zusammen zu erwähnen ist, dass das Mikrotubuli-Netzwerk, das mit einem Fluoreszenz-gekoppelten α -Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht wurde, in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF unverändert war (U. Frede und C. Hagemeyer, unveröffentlicht). Aufgrund der hohen Homologie innerhalb der Tubulin-Familie war es zwar nicht möglich gewesen, die Transkriptmengen von *TUBA3* und *TUBA7* im Gehirn und Rückenmark von EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen mittels *In-situ*-Hybridisierung spezifisch zu detektieren, aber beide Gene waren in allen untersuchten EMA/E2F-6^{-/-}-Geweben einschließlich Gehirn und Rückenmark induziert. Um letztendlich eine Verknüpfung von TUBA3/7 mit EMA/E2F-6 und der Neurodegeneration beweisen zu können, müßten entweder Mäuse mit einer Mutation der E2F-Bindungsstelle in den Promotoren von *TUBA3* und *TUBA7* oder transgene Mäuse generiert werden, die TUBA3/7 in Neuronen und den myelinisierenden Zellen überexprimieren.

Der zentrale Befund der betagten symptomatischen wie nichtsymptomatischen EMA/E2F-6-defizienten Mäuse ist die Demyelinisierung der Axone in ZNS und PNS. Das die Myelinscheide bildende Myelin ist eine Schicht, die zum überwiegenden Teil aus Lipiden (70 % Trockengewicht) aber auch aus Proteinen (30 % Trockengewicht) und Wasser besteht (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Es gibt eine Vielzahl an Proteinen im Myelin, viele mit einem geringen Anteil sind wahrscheinlich noch nicht identifiziert (Colman, et al., 1982). Aber es sind einige wenige, die den Großteil des Myelinproteins ausmachen und zum Teil bisher nur im Myelin nach-

gewiesen wurden. Sie sind Kandidaten für eine EMA/E2F-6-abhängige Expressionsregulation, die bei EMA/E2F-6-Verlust dereguliert sein und krankhafte Veränderung in den myelinbildenden Zellen und Axonen verursachen könnten. Die Konzentration einzelner Proteine im Myelin ist kritisch für die Funktion der Axone, d. h. sowohl Defizienz als auch Überexpression der Proteine bewirken eine axonale Pathologie und degenerative Erscheinungen. Diese Proteine wurden in Tabelle 10 zusammengestellt und die proximalen Promotoren der dazugehörigen Gene auf potentielle E2F-Bindungsstellen durchsucht. In den Promotoren von *MBP* und *CNP* konnte jeweils eine potentielle E2F-Bindungsstelle gefunden werden, die sogar die gleiche zentrale Sequenz TTCCCG wie die konservierten E2F-Bindungsstellen in den *TUBA3/7*-Promotoren enthält (*MBP*) bzw. dieser sehr ähnlich ist (*CNP*). Ein weiterer Anhaltspunkt für eine mögliche EMA/E2F-6-abhängige Regulation sind die Daten aus der Analyse des DNA-Mikroarrays, der bis auf *CNP* die Gene der Myelinproteine in Tabelle 10 repräsentierte. Obwohl, wie bereits beschrieben, die Expressionsdaten aller dieser Gene aufgrund der niedrigen Signalthöhen unter Vorbehalt zu werten sind, ist es bemerkenswert, dass neben der potentielle E2F-Bindungsstelle im Promotor die Transkriptmenge von *MBP* in EMA/E2F-6-defizienten Fibroblasten in der Analyse um mehr als das Neunfache erhöht war. Zusätzlich befindet sich in der Nähe der potentiellen E2F-Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für B-Myb und C-Myb (AATAACTGG), die fast identisch mit einer beschriebenen Myb-Bindungsstelle in SV40-Genom ist (Mizuguchi, et al., 1990). Eine zur E2F-Bindungsstelle benachbarte Myb-Erkennungssequenz konnte auch in den Promotoren von *TUBA3* und *TUBA7* und deren Homologen gefunden werden. Obwohl über eine Funktion der Myb-DNA-Elemente in *TUBA3/7* nichts bekannt ist, wurde für B-Myb eine Rolle bei der E2F-abhängigen Kontrolle der Genexpression in den Zellzyklusphasen G₂ und M beschrieben (Zhu, et al., 2004). Möglicherweise ist auch relevant, dass bei Überexpression von E2F-1, E2F-2 und E2F-3 die Transkriptmenge des *CNP*-Gens drei- bis fünffach gesteigert wird (Müller, et al., 2001). Da EMA/E2F-6 ein Repressor ist, sind außerdem die Phänotypen Myelinprotein-überexprimierender Mauslinien im Hinblick auf einen Vergleich mit dem Phänotyp der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse interessant. Transgene Mäuse, die *CNP* überexprimieren, haben Veränderungen in der Myelinscheide und ihre Oligodendrozyten reifen früher als bei Kontrollmäusen aus. Es wurden allerdings im Gegensatz zu EMA/E2F-6-defizienten Mäusen keine Verhaltensauffälligkeiten beschrieben (Gravel, et al., 1996; Yin, et al., 1997). Die Suche nach der EMA/E2F-6-abhängigen Expression eines Myelinproteins wird durch ein Programm der koordinierten Myelin-Genexpression erschwert, d. h. die Veränderung der Expressionshöhe eines Myelinbestandteils beeinflusst die Expression eines anderen Myelins (Gravel, et al., 1996; Readhead, et al., 1994).

Tabelle 10: **Wichtige Proteinkomponenten des Myelins und potentielle E2F-Bindungsstelle in den Promotoren ihrer Gene**

| Protein | Vorkommen in ZNS/PNS | Anteil am Myelin | E2F-Element im Promotor ^a |
|---|----------------------|-----------------------------------|--|
| <i>Myelin basic protein</i> (MBP) | ZNS und PNS | 30% | Datenbank-Nr.: M24410 5' CCCGGGAA |
| Proteolipidprotein (PLP/DM-20) | ZNS und PNS | häufigstes ZNS-Myelinprotein: 50% | enthält keine E2F-Konsensussequenz |
| Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) | ZNS und PNS | 1% in ZNS 0,1% in PNS | Nur Promotor der Ratte beschrieben, enthält keine E2F-Konsensussequenz |
| Myelin-Oligodendrozytenprotein (MOG) | ZNS-spezifisch | geringer Anteil | enthält keine E2F-Konsensussequenz |
| 2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-Phosphohydrolase (CNP) | ZNS und PNS | 4% des ZNS-Myelins | Datenbank-Nr.: M31810 5' CCGGGGAAA |

^a: Sequenzen im proximalen Promotor, die identisch oder ähnlich zur E2F-Konsensussequenz sind (Slansky and Farnham, 1996). Angegeben sind gegebenenfalls die Zugangsnummern der NCBI-Datenbank.

Die deregulierte Expression von Proteinen mit einem hohen Anteil am Myelingesamtprotein und potentielle E2F-Bindungsstellen im Promotor ihrer Gene sind wichtige Hinweise, dass sie an der Demyelinisierung beteiligt sein könnten. Andererseits ist eine niedrige Expressionshöhe im Myelin selbstverständlich kein Ausschlusskriterium für einen potentiell krankheitsauslösenden Faktor. Aufgrund der großen Vielfalt an Proteinen, die im Myelin zu finden sind (Baumann and Pham-Dinh, 2001), ist ein direkter Zugang über eine Expressionsanalyse in EMA/E2F-6-defizienten Gewebe nicht möglich. Es bietet sich daher eine DNA-Mikroarray-Analyse von Nervengewebe oder von Neuronen- und Oligodendrozytenkulturen aus EMA/E2F-6-defizienten und Wildtyp-Mäusen an. Eine Alternative zur RNA-Analyse ist ein proteomischer Ansatz, da Myelin wegen seiner geringen Dichte einfach über einen Sucrosegradienten gereinigt werden kann (Norton and Poduslo, 1973; Norton and Poduslo, 1973). Proteinspots im zweidimensionalen Gel mit unterschiedlich starken Intensitäten in beiden Ausgangspopulationen könnten isoliert und das dazugehörige Protein mittels Massenspektroskopie ermittelt werden.

Der Hauptbestandteil des Myelins sind allerdings Lipide, die die elektrische Isolation des Axons bewirken. Es gibt zwar keine Myelin-spezifischen Lipide, aber Glykosphingolipide (Galactozamide und Sulfatide) sind charakteristischerweise im Myelin angereichert (Larocca and Rodriguez-Gabin, 2002). Abnormalitäten in lysosomalen Enzymen, die beispielsweise zum Abbau der Glykosphingolipide führen, oder in Proteinen, die den Transport der Fettsäuren zu den Peroxisomen bewerkstelligen, verursachen spezielle Formen der Leukodystrophien (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Bei diesen Leukodystrophien lassen sich pathologische Speicherformen der lysosomalen Enzyme und der Zwischenprodukte innerhalb verschiedener neuraler Zelltypen finden. Solche Speicherformen wurden in EMA/E2F-6-defizienten Mäusen nicht beobachtet. Daher sind Lipide als Auslöser der Demyelinisierung in EMA/E2F-6-defizienten Mäusen unwahrscheinlich.

Das Myelin ist neben der saltatorischen Weiterleitung des Nervenimpulses auch für die Beständigkeit der Axone notwendig (Baumann and Pham-Dinh, 2001). In diesem Zusammenhang könnte das späte Auftreten der Schäden im Nervensystem der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse stehen. Zwölf Monate alte Mäuse hatten noch keine Schäden im Nervensystem. Pathologische Veränderungen und Lähmungen wurden frühestens bei 18 Monate alten Mäusen beobachtet. (Im dazwischenliegenden Zeitraum wurden keine Mäuse untersucht.) Es ist denkbar, dass ein Reparaturmechanismus die Erhaltung der Myelinschichten bzw. der Myelin-bildenden Zellen bis zu diesem Zeitpunkt gewährleistet hat. Möglicherweise bricht die Krankheit aus, weil die Erneuerung ineffizient wurde und sich deshalb das Gleichgewicht von erhaltenden und degenerierenden Einflüssen zum Letzteren verschoben hat. Der Transkriptionsfaktor Olig1 ist für die Reparatur von Demyelinisierungen in der weißen Substanz des ausgereiften Nervensystems, wie sie beispielsweise bei Multipler Sklerose auftreten, notwendig (Arnett, et al., 2004). So konnten experimentell eingeleitete Demyelinisierungen im ZNS von Olig1^{-/-}-Mäusen nur unvollständig repariert werden. Als Ursache der ineffizienten Remyelinisierungen wurde ein Defekt bei der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) zu reifen Oligodendrozyten, also beim Ersatz untergegangener Oligodendrozyten aus multipotenten Vorläufern, identifiziert. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Remyelinisierung in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen nur selten beobachtet werden konnte. Olig1 wird spezifisch in den OPC und den aus ihnen abgeleiteten Zelltypen exprimiert (Zhou and Anderson, 2002). OPC entstehen aus neuralen Stammzellen (NSC), die neben Oligodendrozyten Neurone und Astrozyten bilden [zusammengefasst von (Imitola, et al., 2003)]. NSC sind undifferenzierte und multipotente Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (durch symmetrische Zellteilung) haben und bei der Reparatur von neurodegenerativen und demyelinisierenden Schäden während der gesamten Lebensspanne des Organismus zum Einsatz

kommen. Infolge externer Signale (ausgelöst beispielsweise durch Verletzungen) teilen sich NSC asymmetrisch in eine neue NSC und eine Vorläuferzelle. Die Vorläuferzellen proliferieren dann sehr stark und migrieren zu ihrem Zielort. Die einzelnen Stufen dieses Vorgangs werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und lösen bei Fehlfunktion degenerative Erkrankungen des Nervensystems aus (Imitola, et al., 2003). Schwannzellen, die myelinisierenden Zellen des PNS, entstehen aus neuralen Crest-Stammzellen (NCSC), die mit NSC einen gemeinsamen Vorläuferzelltyp, die neuroepithelialen Stammzellen, haben (Kalyani, et al., 1997; Mujtaba, et al., 1998). Das Pc-G-Protein Bmi-1 ist für die Selbsterneuerung der NSC und NCSC erforderlich (Molofsky, et al., 2003). Bmi-1^{-/-}-NSC und -NCSC haben eine erniedrigte Selbsterneuerungskapazität, die zu einer progressiven Dezimierung beider Stammzell-Pools bereits ab der Geburt führt. Zu erwähnen mit Blick auf den möglicherweise dosisabhängigen degenerativen Phänotyp EMA/E2F-6^{+/-}-Mäuse ist, dass Bmi-1^{+/-}-NSC und -NCSC ebenfalls einen, wenn auch abgeschwächten, Defekt in der Selbsterneuerung haben. Der generelle Defekt ist auf eine erniedrigte Proliferation der Bmi-1-mutierten NSC und NCSC zurückzuführen. So ist die Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* in Bmi-1^{-/-}-NSC und -NCSC erhöht. In Übereinstimmung damit führt *p16^{INK4a}*-Defizienz zu einer deutlich gesteigerten Selbsterneuerungsrate der Bmi-1^{-/-}-NSC und -NCSC (Molofsky, et al., 2003). Die Steigerung ist gekoppelt mit einem Anstieg der Proliferation der Stammzellen. Diese Ergebnisse deuten auf eine hemmende Funktion von *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* bei der postnatalen Selbsterneuerung der NSC und NCSC hin. Ein Defekt in der Stammzellenrenewal mündet schrittweise in einer Erschöpfung des Vorläuferzellpools und folglich in einer nachlassenden Reparaturleistung des Systems, die wiederum in neurologischen Ausfällen kumuliert (Imitola, et al., 2003). Es ist bereits sehr früh darüber spekuliert worden, ob EMA/E2F-6 Bmi-1 an die Promotoren der Zellzyklusinhibitoren *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* rekrutiert (Trimarchi, et al., 1998), aber bis heute gibt es keine experimentellen Belege dafür. Unsere Analysen haben gezeigt, dass beide Gene in EMA/E2F-6-defizienten MEF nicht dereguliert sind (U. Frede und C. Hagemeier, unveröffentlicht) und die Proliferation dieser Zellen normal ist. Im Gegensatz dazu, haben EMA/E2F-6^{-/-}-T-Lymphozyten eine erniedrigte Proliferationsrate. Allerdings sind die Expressionsniveaus von *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* in diesen Zellen noch nicht untersucht. So ist es denkbar, dass sich diese Zelltyp-spezifische Funktion von EMA/E2F-6 auch negativ auf die Proliferation der NSC und NCSC auswirkt. Als Konsequenz könnte die Demyelinisierung in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen auf eine nicht ausreichende Erneuerung zu Grunde gegangener Oligodendrozyten und Schwannzellen zurückgeführt werden. Das späte Auftreten der degenerativen Veränderungen (wie auch die nach EMA/E2F-6-Verlust geringere Verminderung der Proliferationskapazität der Lymphozyten als nach Bmi-1-Verlust) könnte damit erklärt werden, dass das Fehlen von EMA/E2F-6 die Expression von Bmi-1-Zielgenen nur begrenzt dereguliert. D. h. das Fehlen von EMA/E2F-6 führt langsam zu einer Reduktion des neuralen Stammzellpools, die erst im Alter für die Reparaturleistung des Nervensystems kritisch wird. Übereinstimmende Merkmale der Phänotypen von EMA/E2F-6^{-/-}- und Bmi-1^{-/-}-Mäusen wie die Lähmung ihrer Hinterbeine, degenerierte Neurone und die astrozytäre Gliose in der weißen Substanz unterstützen die Hypothese einer Bmi-1-abhängigen Demyelinisierung EMA/E2F-6-defizienter Mäuse. In diesem Fall sollten doppelt mutierte EMA/E2F-6/Bmi-1-Mäuse eine dramatische Ausprägung der Phänotypen haben als die Mäuse, bei denen nur eines der Gene mutiert ist. Ob die Fähigkeit zur Remyelinisierung EMA/E2F-6-abhängig ist, kann experimentell getestet werden, indem bei EMA/E2F-6-defizienten und Wildtyp-Mäusen Demyelinisierungen durch Behandlung mit einem Oligodendrozytengift wie Cuprizin, Lyssolecithin oder Ethidiumbromid chemisch induziert wird und die Remyelinisierungsraten in beiden Mäusegruppen verglichen wird. Außerdem können die Läsionen auf das Einwandern von Vorläuferzellen wie den OPC untersucht werden.

Das Myelinprotein MAG ist als ein weiterer Kandidat einer EMA/E2F-6-abhängigen Transkriptionsregulation in Verbindung mit Reparaturprozessen des Nervensystems zu nennen, da die MAG-Expression in den EMA/E2F-6^{-/-}-MEF in der G₀-Phase um das 2,6-Fache erhöht waren. MAG ist *in vitro* und *in vivo* ein potenter Inhibitor der axonalen Regeneration in der weißen Substanz (Filbin, 1996).

4.2 Eine Rolle von EMA/E2F-6 in der Inaktivierung männlicher Keimbahngene in somatischen Zellen

Die meisten der per DNA-Mikroarray-Analyse als in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF dereguliert identifizierten Gene lassen sich in zwei Gruppen bezüglich ihrer Expression einteilen. Die Expression einer Gengruppe ist sowohl in wachsenden als auch in der G₀-Phase arretierten EMA/E2F-6^{-/-}-MEF erhöht (*TUBA3*, *TUBA7*, *OST-PTP*) und die andere Gruppe ist nur in der G₀-Phase dereprimiert (*Tetranektin*, *Ly-6E.1*, *Dlk1*, *Dpt*). Allerdings gibt es auch andere Expressionsmuster wie bei *Gas2*, das nur in wachsenden MEF hochreguliert ist. Durchsucht man ihre Promotorbereiche nach der E2F-Konsensussequenz TTSSCGC (Slansky and Farnham, 1996), kann man nur bei einem Teil der Gene eine entsprechende Sequenz finden. Möglicherweise existiert bei den Genen ohne E2F-Bindungsstelle (*Tetranektin*, *Dlk1*) ein genereller Mechanismus der EMA/E2F-6-abhängigen Transkriptionsregulation alternativ zur Regulation von Genen mit E2F-Bindungsstellen, da auch andere solcher Gene beschrieben wurden (Oberley, et al., 2003). Als Mechanismus denkbar ist die Existenz von weiteren Proteinen mit DNA-Bindungsaffinität neben EMA/E2F-6 im selben Komplex, wie es für das Mad/Max-Heterodimer gezeigt wurde (Ogawa, et al., 2002). Eventuell ist in solchen Fällen die Anwesenheit von EMA/E2F-6 im Komplex – beispielsweise als Brückenprotein - erforderlich, aber die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz wird von dem anderen DNA-bindenden Protein vermittelt. Alternative Erklärungen des Phänomens wären distale *Enhancer* mit EMA/E2F-6-sensitiven Bindungsstellen, die folglich bei einer Promotorsequenz-Analyse nicht identifiziert werden würden oder die indirekte Regulation dieser Gene durch EMA/E2F-6, d. h. es ist ein weiterer Faktor zwischen EMA/E2F-6 und das regulierte Gen geschaltet.

Die Sequenz der E2F-Bindungsstelle TTCCCGC in *TUBA3/7* ist mit der in einem Bindungsstellen-Selektionierungsexperiment mit einem rekombinanten EMA/E2F-6/DP-1-Dimer ermittelten hochaffinen Bindungsstelle identisch (Morkel, 1999). *TUBA3/7* werden nicht in den somatischen Zellen des Hodens exprimiert, sondern in den Keimbahnzellen, den Spermatogonien (Wang, et al., 2001). In dieser Studie sind auch andere Spermatogonien-spezifische Gene beschrieben, die allerdings nicht auf dem DNA-Mikroarray, der in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, repräsentiert waren. Die Expressionsanalyse dieser Gene hat gezeigt, dass mit *Tex12* (Testis expressed 12) weitere männliche Keimbahngene in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF dereprimiert sind. Bemerkenswert ist, dass der *Tex12*-Promotor auch eine E2F-Bindungsstelle hat, die mit der im *TUBA3/7*-Promotor identisch ist (Pohlers, et al., 2005). Dagegen haben E2F-Bindungsstellen in anderen Genen, für deren korrekte Expression EMA/E2F-6 nicht essentiell ist und die neben EMA/E2F-6 auch von E2F-4 reguliert werden, eine abweichende Sequenz haben (Giangrande, et al., 2004). Es konnte nur die Bindung von exogenem EMA/E2F-6 an die *TUBA3/7*-E2F-Bindungsstelle gezeigt werden. Extrakte aus Wildtyp-MEF erzeugten kein zusätzliches Signal zu den EMA/E2F-6^{-/-}-Extrakten in den Gelretardationsexperimenten. Endogene EMA/E2F-6-DNA-Komplexe sollten erwartungsgemäß wegen der vielen weiteren assoziierten Proteine sehr groß sein (Attwooll, et al., 2004; Ogawa, et al., 2002). Möglicherweise können solche Komplexe in Gelretardationsexperimenten nicht dargestellt werden, da sie zu labil sind oder sie wegen ihrer enormen Größe nicht in das Gel einwandern können. In Übereinstimmung damit sind bisher keine endogenen EMA/E2F-6-

DNA-Komplexe publiziert worden. Diese Erklärungsansätze werden dadurch unterstützt, dass exogenes EMA/E2F-6 in diesen Experimenten nur einem kleinen DNA-Protein-Komplex erzeugt hatte.

Die funktionelle Relevanz der E2F-Bindungsstelle im *TUBA3*-Promotor wurde im Reporter-Gen-Assay gezeigt. Sowohl in HeLa-Zellen als auch in MEF wirkte diese Bindungsstelle als negatives Kontrollelement auf die Promotoraktivität, da ihre Punktmutation oder Deletion zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des Reportergens führten. Außerdem war der Wildtyp-Promotor in Abwesenheit von EMA/E2F-6 aktiver als in Wildtyp-MEF. Die Mutation der E2F-Bindungsstelle hatte zu einer weiteren Aktivitätssteigerung des Promotors in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF geführt. D. h. es gibt neben EMA/E2F-6 noch weitere reprimierende E2F-Komplexe, die in dem transienten Experimentalsystem den *TUBA3*-Promotor möglicherweise artifiziell hemmen. Somit konnte die physiologische Konstellation auf dem *TUBA3*-Promotor nur begrenzt *in vitro* abgebildet werden, da die Abwesenheit von EMA/E2F-6 alleine in MEF und Geweben zur Derepression der Promotoren geführt haben mußte. Diese zusätzlichen repressorischen Komplexe können E2F/Pocketprotein-Komplexe mit den assoziierten Chromatin-modifizierenden Enzymen (Frolov and Dyson, 2004) und/oder E2F-7 und E2F-8 sein, über deren Funktion und Wirkungsweise man nur wenig weiß, beide aber als Repressoren wirken (De Bruin, et al., 2003; Di Stefano, et al., 2003; Maiti, et al., 2005). In den Gelretardationsexperimenten in MEF haben auch größere Komplexe als die „freien“ E2F an die *TUBA3*-E2F-Bindungsstelle gebunden (Daten nicht gezeigt). Da in HeLa-Zellen zumindest die E2F/Pocketprotein-Komplexe durch die Anwesenheit des E7-Proteins des humanen Papillomavirus nicht existieren, könnte hier die Derepression der E2F-mutierten Promotoren dadurch bedingt sein, dass EMA/E2F-6 allein nicht mehr wirken kann. Diese Theorie wird durch die geringere Derepression in HeLa-Zellen unterstützt, die in ihrem Ausmaß der Derepression in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF entspricht.

Die Expression von *TUBA3/7* und *Tex12* war in den Wildtyp-Zellen nicht nachweisbar. Sie wurde infolge des EMA/E2F-6-Verlust induziert. Dies weist darauf hin, dass EMA/E2F-6 diese Gene „abgeschaltet“ hat. Naheliegender ist eine Veränderung der Chromatinstruktur der Promotoren, die zu einer Inaktivierung der Gene (*silencing*) führt. EMA/E2F-6 wurde im Komplex mit Chromatin-modulierenden Enzymen wie Histonmethyltransferasen und HP1γ gefunden (Ogawa, et al., 2002). Der Nachweis dieser Faktoren führte zu der im Kapitel 1.2.3 beschriebenen Hypothese der EMA/E2F-6-abhängigen Genrepression durch Chromatinmodulation (La Thangue, 2002). In Übereinstimmung damit enthält der proximale *TUBA3*-Promotor eine vorhersagbare CpG-Insel. Eine direkte Analyse seines Methylierungszustandes zeigte, dass der Promotor in Wildtyp-MEF methyliert ist und diese Methylierung in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF deutlich reduziert ist (Pohlers, et al., 2005). Außerdem haben in den Gelretardationsexperimenten neben E2F-4 noch andere DP-abhängige Komplexe, möglicherweise auch aktivierende E2F-Komplexe, an die E2F-Bindungsstelle im *TUBA7*-Promotor gebunden. Diese Annahme wurde von einer Analyse der *in vivo* diese E2F-Bindungsstelle bindenden Faktoren mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) bestätigt (Pohlers, et al., 2005). Nach EMA/E2F-6-Verlust bindet das aktivierende E2F-1 an diese E2F-Bindungsstelle. Zusätzlich ist der Promotor in EMA/E2F-6^{-/-}-Zellen auch für andere Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und NF-Y zugänglich geworden sein, wie ebenfalls per ChIP und in einer genomischen *Footprint*-Analyse gezeigt wurde (Pohlers, et al., 2005). In Wildtyp-MEF konnte keine EMA/E2F-6-Bindung an die E2F-Bindungsstelle nachgewiesen werden. Da die siRNA-Behandlung von MEF zur Eliminierung der EMA/E2F-6-Expression keine Derepression der *TUBA3/7*- und *Tex12*-Gene bewirkt hatte (M. Truß und C. Hagemeyer, unveröffentlicht), deuten beide Ergebnisse darauf hin, dass die EMA/E2F-6-abhängige Geninaktivierung in einem sehr frühen Entwicklungsstadium bewirkt wird, EMA/E2F-6 danach nicht mehr dazu benötigt wird und diese Inaktivierung sehr langfristig ist (*gene silencing*). Zusammenfassend können diese Daten in dem

folgenden hypothetischen Mechanismus münden: Eine Gruppe von männlichen Keimbahn-spezifischen Genen wird in somatischen Zellen durch EMA/E2F-6 mittels Methylierung in einem frühen Entwicklungsstadium inaktiviert. Die Aufhebung der Methylierung (beispielsweise infolge des EMA/E2F-6-Verlustes) führt wahrscheinlich zu einer zusätzlichen Aktivierung der Promotoren durch andere Transkriptionsfaktoren, unter den aktivierende E2F sind.

Warum kann der Verlust von EMA/E2F-6 nicht durch E2F-4 (oder andere repressorische E2F-Komplexe) bei der *TUBA3/7*-Expressionskontrolle kompensiert werden, wie es für einige Gene mit Funktionen während des Zellzyklus gezeigt wurde (Giangrande, et al., 2004)? Zumindest in der Milz und in MEF ist das E2F-4-Protein deutlich nachweisbar und steht somit potentiell für die *TUBA3/7*-Repression zur Verfügung (Humbert, et al., 2000; Rempel, et al., 2000). Außerdem konnte *in vitro* eine Wechselwirkung von E2F-4 mit dem *TUBA7*-Promotor beobachtet werden. Ob E2F-4 auch unter physiologischen Bedingungen an diese E2F-Bindungsstelle bindet, ist nicht bekannt. Es ist denkbar, dass die Eigenschaft der E2F-Bindungsstelle durch flankierende DNA-Elemente reguliert wird. Für mehrere Promotoren wurde gezeigt, dass Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren die Bindung von E2F an den Promotor positiv – unter anderem CCAAT-Boxen – (Giangrande, et al., 2004; Zhu, et al., 2004) oder negativ (Giangrande, et al., 2004) beeinflussen. Solche DNA-Elemente können durch Mutagenese der klonierten Promotoren in ChIP-Analysen transfizierter Plasmide direkt auf Bindung bestimmter Proteine untersucht werden (Giangrande, et al., 2004; Zhu, et al., 2004). Konkret weist man in diesem Fall nach, ob sich die Affinität zu der Bindungsstelle beispielsweise von E2F-4 oder auch von EMA/E2F-6 nach der Mutation anderer Promotorelemente verändert hat. Beim Vergleich der Promotorsequenzen von *TUBA3/7* und ihrer Homologen in anderen Vertebraten bieten sich dafür die CCAAT-Boxen und die potentielle Myb-Bindungsstelle an (Abb. 32). Der *MBP*-Promotor, der eine ebenfalls eine potentielle E2F-Bindungsstelle mit der zentralen Sequenz TCCCG enthält und in EMA/E2F-6^{-/-}-MEF stark hochreguliert ist, hat ebenfalls eine CCAAT-Box und eine potentielle Myb-Bindungsstelle. Eine andere Erklärung der fehlenden Kompensation durch andere E2F könnte im Mechanismus der EMA/E2F-6-abhängigen Inaktivierung liegen. Bisher wurde für kein anderes E2F eine Funktion in der Langzeitinaktivierung von Genen beschrieben. Doppelt negative E2F-4/E2F-6- und E2F-5/E2F-6-Mäuse werden zeigen, in welchem Ausmaß E2F-4 bzw. E2F-5 EMA/E2F-6-abhängige Funktionen in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen kompensieren.

Die Expression von *TUBA3/7* und dem Homolog des Menschen *TUBA2* sowie von *Tex12* ist unter normalen Bedingungen auf die Hoden beschränkt (Dode, et al., 1998; Lewis and Cowan, 1988; Villasante, et al., 1986; Wang, et al., 2001). Demzufolge gibt es eine Gruppe hodenspezifischer Gene, für deren kontrollierte Transkription EMA/E2F-6 notwendig ist. Andererseits gibt es Zellzyklus-regulierte Gene, an deren Kontrolle EMA/E2F-6 zwar beteiligt ist aber dafür nicht essentiell ist. Bemerkenswert ist, dass in *Drosophila* eine Gruppe hodenspezifischer Gene (Gruppe E) beschrieben wurde, deren stabile Repression, auch in Weibchen, von dE2F2-Komplexen abhängig ist (Dimova, et al., 2003). dE2F2 ist ebenfalls mit einer Reihe von Zellzyklus-regulierten Genen assoziiert, ist aber nicht für deren Regulation absolut erforderlich. Die Expression der Gruppe E-Gene ist Zellzyklus-unabhängig, dE2F2/RBF1 bzw. dE2F2/RBF2 bleiben auch während der S-Phase an die Promotoren gebunden. RBF1 und RBF2 sind die Pocketprotein-Homologen, die nach ihrer Phosphorylierung von dE2F1 dissoziieren und so die Transkription der Zielgene in der S-Phase erlauben. So existiert offenbar ein Programm der Transkriptionsregulation geschlechtsspezifischer Gene, dass zumindest zwischen *Drosophila* und Vertebraten konserviert ist. In Vertebraten wird dieses Programm offenbar spezifisch durch EMA/E2F-6 reguliert und ist damit von anderen E2F entkoppelt.

4.3 Der Verlust von EMA/E2F-6 hat einen milden Einfluss auf Polycomb-Protein-abhängige Funktionen

In der Analyse Pc-G-protein-abhängiger Phänotypen wurde der Fokus auf die Phänotypen von Bmi-1^{-/-}-Mäusen gelegt. Die Defekte dieser Mäuse in EMA/E2F-6^{-/-}-Mäusen waren deutlich abgeschwächt (Lymphozyten-Proliferationsdefekt, Skeletttransformationen, degenerative Veränderungen der weißen Substanz im ZNS) oder nicht nachzuweisen (Tremor und epileptische Anfälle, spezifische Kleinhirnveränderungen, kurze Lebensspanne). Es ist außerdem möglich, dass die späteinsetzenden neuropathologischen Veränderungen in EMA/E2F-6-defizienten Mäusen auf einen abgemilderten Bmi-1-abhängigen Defekt bei der Stammzellerneuerung zurückzuführen sind (siehe vorn). Die nur schwache Ausprägung der Bmi-1-abhängigen Veränderung sind übereinstimmend mit einer anderen Studie über EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse (Storre, et al., 2002). Diese Mäuse verhalten sich (zumindest bis zum zwölften Lebensmonat) unauffällig, und die Skeletttransformationen sind nur in den kaudalen Wirbeln und dort auch mit vergleichsweise reduzierter Penetranz beobachtet worden.

Hox-Gene stellen eine große Gruppe von Pc-G-Zielgenen dar (Jacobs and van Lohuizen, 1999). Die Verschiebung der Expressionsregionen von *Hox*-Genen verursachen veränderte Segmentgrenzen, die zu Wirbelkörpertransformationen führen (Akasaka, et al., 1996; Akasaka, et al., 2001). In EMA/E2F-6^{-/-}-MEF war die Expression der beiden Bmi-1- und Mel-18-Zielgene *Hoxc6* und *Hoxc8* nicht dereguliert (U. Frede und C. Hagemeier, unveröffentlicht). Außerdem ist eine E2F-abhängige Transkriptionsregulation von *Hox*-Genen bisher nicht beschrieben worden. Obwohl EMA/E2F-6 als Komponente von verschiedenen Pc-G-Komplexen identifiziert wurde, wurde der funktionelle Beitrag von EMA/E2F-6 bei der Zielgenerkennung nur ansatzweise bestimmt (Ogawa, et al., 2002). Die milden Defekte der EMA/E2F-6^{-/-}-Mäuse weisen auf eine nicht essentielle Bedeutung von EMA/E2F-6 zumindest bei einigen Pc-G-Proteinfunktionen hin. Das kann verschiedene Ursachen haben: (1) Die DNA-Bindungsspezifität von EMA/E2F-6 kann innerhalb des Komplexes von einem anderen DNA-bindenden Protein übernommen werden. Das Dimer der Transkriptionsfaktoren Mga/Max wurde zusammen mit EMA/E2F-6 in einem Pc-G-Komplex gefunden und konnten gleichzeitig mit EMA/E2F-6 an mehreren Promotoren von Zellzyklus-regulierten Genen nachgewiesen werden (Ogawa, et al., 2002). Allerdings ist die Expressionsregulation von *Hox*-Genen oder von *INK4a/ARF* durch Mga/Max nicht beschrieben. (2) Der Verlust von EMA/E2F-6 wird durch andere E2F-Komplexe kompensiert. E2F-4 kann den Verlust von EMA/E2F-6 an G₁/S-regulierten Promotoren kompensieren (Giangrande, et al., 2004). Ob aber bei der Regulation dieser Promotoren normalerweise Pc-G-Proteine beteiligt sind, ist nicht bekannt. Es wurde indes gezeigt, dass bei der Repression von G₂/M-exprimierten Genen E2F-pRb mit dem PRC1-Proteinen HPC2 und RING1 wechselwirken und so den Eintritt der Zellen in die Mitose verhindern (Dahiya, et al., 2001). Da Ring 1 auch mit EMA/E2F-6 in einem Komplex nachweisbar ist und HPC2 mit Bmi-1 in einem Komplex gefunden wurde, drängt sich die Vermutung auf, dass die Zusammensetzung dieser Multiproteinkomplexe so variabel ist, dass entweder die Anwesenheit verschiedener E2F wechseln oder dass gleichzeitig verschiedene E2F anwesend sein können (Ogawa, et al., 2002; Pirrotta, 1998; Trimarchi, et al., 2001). In *Xenopus* ist das E2F-3-Homologe xE2F an der Regulation von *Hox*-Genen und der Ausbildung der Körperachse beteiligt (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000). (3) Die Funktionen der EMA/E2F-6-Komplexe werden von anderen Pc-G-Komplexen ausgeführt. Funktionelle Kompensation zwischen Pc-G-Proteinen ist vielfach beschrieben worden [zusammengefasst von (Jacobs and van Lohuizen, 1999)]. (4) EMA/E2F-6 ist an der Regulation von Pc-G-Zielgenen beteiligt, die nur eine untergeordnete Rolle bei den untersuchten Pc-G-abhängigen Prozessen spielen.

Dagegen spricht allerdings, dass mehrere Bmi-1-abhängige Prozesse, bei denen verschiedene Bmi-1-Zielgene wichtig sind, gleichermaßen schwach betroffen sind. (5) EMA/E2F-6 hat keine Funktion in Pc-G-abhängigen Prozessen, und die Ähnlichkeiten bei den Phänotypen von EMA/E2F-6^{-/-}- und Bmi-1^{-/-}-Mäusen beruhen auf eigenständigen Funktionen der Faktoren, die in sich überschneidende Prozesse involviert sind.

Die von einer anderen Arbeitsgruppe publizierten Veränderungen der Mengen verschiedener Zellen im Hoden und Nebenhoden von EMA/E2F-6^{-/-}-Männchen konnten nicht reproduziert werden (Storre, et al., 2002). Sowohl in der vorliegenden als auch in der publizierten Arbeit wurde gezeigt, dass es sich bei den generierten Mäusen um sogenannte Nullmutanten handelt, d. h. die Tiere EMA/E2F-6 nicht exprimieren. So besteht der einzige offensichtliche Unterschied beider Mausstämmen in ihrem genetischen Hintergrund, da in beiden Studien ES-Zellklone aus verschiedenen Mausstämmen verwendet worden sind. Genetische *Modifier* können die Ursache für die abweichenden Befunde sein, weil sie die stammspezifische Ausprägung einer Veränderung stark beeinflussen können (Classon and Dyson, 2001; Cloud, et al., 2002; Harvey, et al., 1993; Pearson, 2002).

Anhand der makroskopischen und histologischen Untersuchungen gestorbener und kranker Mäuse konnte gezeigt werden, dass EMA/E2F-6-Abwesenheit das Tumorspektrum und die Tumorraten nicht verändert. In diesem Zusammenhang zu sehen ist, dass EMA/E2F-6-defiziente MEF keinen Proliferationsdefekt hatten und somit EMA/E2F-6 für die Zellproliferation generell nicht limitierend ist. Das Ergebnis besagt indes nicht, dass EMA/E2F-6 keine Rolle bei der Tumorbildung spielt. Hier ist ebenfalls eine funktionelle Redundanz mit den reprimierenden E2F-4 und E2F-5 denkbar. Gemeinsame Zielgene von EMA/E2F-6 und E2F-4, die normalerweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus reprimiert werden, sind Gene mit Funktionen bei der DNA-Synthese oder der Zellzyklusregulation (Giangrande, et al., 2004). In doppelt negativen E2F-4/E2F-6-Mäusen könnte daher die Repression dieser Gruppen wichtiger Gene in der G₁-Phase und am G₁/S-Phase-Übergang unvollständig sein oder gar fehlen und in Folge die negative Kontrolle des Zellwachstums aufgehoben sein. E2F-4^{-/-}-Mäuse haben zwar auch keine veränderte Inzidenz für Tumorerkrankungen, aber die *E2F-4*-Inaktivierung hemmt die Entstehung bestimmter Tumore in pRb^{+/-}-Mäusen, wahrscheinlich durch die Bildung alternativer Repressorkomplexe (Lee, et al., 2002). *E2F-1/E2F-2*-mutierte Mäuse, die im Vergleich mit Mäusen, bei denen nur eines der beiden Gene mutiert ist, einen Anstieg der Tumorraten haben, sind ein Beispiel für das Zusammenwirken von E2F-Familienmitgliedern bei der malignen Transformation (Zhu, et al., 2001).

5 Referenzen

- Ainger, K.; Avossa, D.; Morgan, F.; Hill, S. J.; Barry, C.; Barbarese, E. and Carson, J. H. (1993): Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes, *J Cell Biol* (vol. 123), No. 2, pp. 431-41.
- Akasaka, T.; Kanno, M.; Balling, R.; Mieza, M. A.; Taniguchi, M. and Koseki, H. (1996): A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanterior-posterior specification of the axial skeleton, *Development* (vol. 122), No. 5, pp. 1513-22.
- Akasaka, T.; Tsuji, K.; Kawahira, H.; Kanno, M.; Harigaya, K.; Hu, L.; Ebihara, Y.; Nakahata, T.; Tetsu, O.; Taniguchi, M. and Koseki, H. (1997): The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors, *Immunity* (vol. 7), No. 1, pp. 135-46.
- Akasaka, T.; van Lohuizen, M.; van der Lugt, N.; Mizutani-Koseki, Y.; Kanno, M.; Taniguchi, M.; Vidal, M.; Alkema, M.; Berns, A. and Koseki, H. (2001): Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of *Hox* gene expression, *Development* (vol. 128), No. 9, pp. 1587-97.
- Araki, K.; Nakajima, Y.; Eto, K. and Ikeda, M. A. (2003): Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter, *Oncogene* (vol. 22), No. 48, pp. 7632-41.
- Arnett, H. A.; Fancy, S. P.; Alberta, J. A.; Zhao, C.; Plant, S. R.; Kaing, S.; Raine, C. S.; Rowitch, D. H.; Franklin, R. J. and Stiles, C. D. (2004): bHLH transcription factor *Olig1* is required to repair demyelinated lesions in the CNS, *Science* (vol. 306), No. 5704, pp. 2111-5.
- Asano, M.; Nevins, J. R. and Wharton, R. P. Secondary author (1996): Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs, *Genes Dev* (vol. 10), No. 11, pp. 1422-32.
- Attwooll, C.; Denchi, E. L. and Helin, K. (2004): The E2F family: specific functions and overlapping interests, *Embo J* (vol. 11), p. 11.
- Attwooll, C.; Oddi, S.; Cartwright, P.; Prosperini, E.; Agger, K.; Steensgaard, P.; Wagener, C.; Sardet, C.; Moroni, M. C. and Helin, K. (2004): A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner, *J Biol Chem* (vol. 8), p. 8.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, *Physiol Rev* (vol. 81), No. 2, pp. 871-927.
- Berns, A. (2003): Tumour suppressors: timing will tell, *Nature* (vol. 424), No. 6945, pp. 140-1.
- Bjartmar, C.; Yin, X. and Trapp, B. D. (1999): Axonal pathology in myelin disorders, *J Neurocytol* (vol. 28), No. 4-5, pp. 383-95.
- Blake, M. C. and Azizkhan, J. C. (1989): Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo, *Mol Cell Biol* (vol. 9), No. 11, pp. 4994-5002.
- Bömmel, H.; Xie, G.; Rossoll, W.; Wiese, S.; Jablonka, S.; Boehm, T. and Sendtner, M. (2002): Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (*Tbce*) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease, *J Cell Biol* (vol. 159), No. 4, pp. 563-9.
- Botz, J.; Zeffass-Thome, K.; Spitkovsky, D.; Delius, H.; Vogt, B.; Eilers, M.; Hatzigeorgiou, A. and Jansen-Durr, P. (1996): Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 7, pp. 3401-9.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* (vol. 72), pp. 248-54.
- Bradley, A.; Evans, M.; Kaufman, M. H. and Robertson, E. Secondary author (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature* (vol. 309), No. 5965, pp. 255-6.
- Bradley, A. and Robertson, E. (1986): Embryo-derived stem cells: a tool for elucidating the developmental genetics of the mouse, *Curr Top Dev Biol* (vol. 20), pp. 357-71.
- Bradley, W. G. (1987): Recent views on amyotrophic lateral sclerosis with emphasis on electrophysiological studies, *Muscle Nerve* (vol. 10), No. 6, pp. 490-502.
- Cartwright, P.; Muller, H.; Wagener, C.; Holm, K. and Helin, K. (1998): E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription, *Oncogene* (vol. 17), No. 5, pp. 611-23.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol Cell Biol* (vol. 7), No. 8, pp. 2745-52.
- Clarke, A. R.; Maandag, E. R.; van Roon, M.; van der Lugt, N. M.; van der Valk, M.; Hooper, M. L.; Berns, A. and te Riele, H. Secondary author (1992): Requirement for a functional *Rb-1* gene in murine development, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 328-30.

- Classon, M. and Dyson, N. (2001): p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets, *Exp Cell Res* (vol. 264), No. 1, pp. 135-47.
- Classon, M.; Salama, S.; Gorka, C.; Mulloy, R.; Braun, P. and Harlow, E. Secondary author (2000): Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 20, pp. 10820-5.
- Cloud, J. E.; Rogers, C.; Reza, T. L.; Ziebold, U.; Stone, J. R.; Picard, M. H.; Caron, A. M.; Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2002): Mutant Mouse Models Reveal the Relative Roles of E2F1 and E2F3 In Vivo, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 8, pp. 2663-2672.
- Colman, D. R.; Kreibich, G.; Frey, A. B. and Sabatini, D. D. (1982): Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin, *J Cell Biol* (vol. 95), No. 2 Pt 1, pp. 598-608.
- Consortium, Mouse Genome Sequencing (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* (vol. 420), No. 6915, pp. 520-62.
- Cress, W. D. and Nevins, J. R. (1996): A role for a bent DNA structure in E2F-mediated transcription activation, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 5, pp. 2119-27.
- Dagnino, L.; Fry, C. J.; Bartley, S. M.; Farnham, P.; Gallie, B. L. and Phillips, R. A. (1997): Expression patterns of the E2F family of transcription factors during mouse nervous system development, *Mech Dev* (vol. 66), No. 1-2, pp. 13-25.
- Dahiya, A.; Wong, S.; Gonzalo, S.; Gavin, M. and Dean, D. C. (2001): Linking the rb and polycomb pathways, *Mol Cell* (vol. 8), No. 3, pp. 557-69.
- Dahme, T.; Wood, J.; Livingston, D. M. and Gaubatz, S. (2002): Two different E2F6 proteins generated by alternative splicing and internal translation initiation, *Eur J Biochem* (vol. 269), No. 20, pp. 5030-6.
- Dalton, S. (1992): Cell cycle regulation of the human cdc2 gene, *Embo J* (vol. 11), No. 5, pp. 1797-804.
- Dannenberg, J. H.; van Rossum, A.; Schuijff, L. and te Riele, H. Secondary author (2000): Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions, *Genes Dev* (vol. 14), No. 23, pp. 3051-64.
- De Bruin, A.; Maiti, B.; Jakoi, L.; Timmers, C. and Leone, G. (2003): Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J Biol Chem* (vol. 31), p. 31.
- de Stanchina, E.; McCurrach, M. E.; Zindy, F.; Shieh, S. Y.; Ferbeyre, G.; Samuelson, A. V.; Prives, C.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. and Lowe, S. W. (1998): E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor, *Genes Dev* (vol. 12), No. 15, pp. 2434-42.
- DeGregori, J. (2002): The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1602), No. 2, pp. 131-50.
- DeGregori, J.; Kowalik, T. and Nevins, J. R. Secondary author (1995): Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 8, pp. 4215-24.
- DeGregori, J.; Leone, G.; Miron, A.; Jakoi, L. and Nevins, J. R. (1997): Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 14, pp. 7245-50.
- DeGregori, J.; Leone, G.; Ohtani, K.; Miron, A. and Nevins, J. R. Secondary author (1995): E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity, *Genes Dev* (vol. 9), No. 23, pp. 2873-87.
- Di Stefano, L.; Jensen, M. R. and Helin, K. (2003): E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes, *Embo J* (vol. 22), No. 23, pp. 6289-98.
- Dimova, D. K.; Stevaux, O.; Frolov, M. V. and Dyson, N. J. (2003): Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway, *Genes Dev* (vol. 17), No. 18, pp. 2308-20.
- Dode, C.; Weil, D.; Levilliers, J.; Crozet, F.; Chaib, H.; Levi-Acobas, F.; Guilford, P. and Petit, C. (1998): Sequence characterization of a newly identified human alpha-tubulin gene (TUBA2), *Genomics* (vol. 47), No. 1, pp. 125-30.
- Du, W.; Xie, J. E. and Dyson, N. Secondary author (1996): Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the Drosophila eye, *Embo J* (vol. 15), No. 14, pp. 3684-92.
- Dunham, N. W. and Miya, T. S. (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice, *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* (vol. 46), No. 3, pp. 208-9.
- Duronio, R. J.; Bonnette, P. C. and O'Farrell, P. H. (1998): Mutations of the Drosophila dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 1, pp. 141-51.
- Dynlacht, B. D.; Brook, A.; Dembski, M.; Yenush, L. and Dyson, N. (1994): DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 14, pp. 6359-63.
- Dyson, N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins, *Genes Dev* (vol. 12), No. 15, pp. 2245-62.
- Emili, A. and Ingles, C. J. (1995): Promoter-dependent photocross-linking of the acidic transcriptional activator E2F-1 to the TATA-binding protein, *J Biol Chem* (vol. 270), No. 23, pp. 13674-80.

- Evans, M. J. and Kaufman, M. H. Secondary author (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* (vol. 292), No. 5819, pp. 154-6.
- Fajas, L.; Landsberg, R. L.; Huss-Garcia, Y.; Sardet, C.; Lees, J. A. and Auwerx, J. (2002): E2Fs Regulate Adipocyte Differentiation, *Dev Cell* (vol. 3), No. 1, pp. 39-49.
- Field, S. J.; Tsai, F. Y.; Kuo, F.; Zubiaga, A. M.; Kaelin, W. G., Jr.; Livingston, D. M.; Orkin, S. H. and Greenberg, M. E. (1996): E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation, *Cell* (vol. 85), No. 4, pp. 549-61.
- Filbin, M. T. (1996): The muddle with MAG, *Mol Cell Neurosci* (vol. 8), No. 2-3, pp. 84-92.
- Finkbeiner, M. G. (1998): Klonierung sowie strukturelle und funktionelle Analyse des humanen EMA Promotors, Fachbereich Chemie, Freie Universität, Berlin.
- Frolov, M. V. and Dyson, N. J. (2004): Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression, *J Cell Sci* (vol. 117), No. Pt 11, pp. 2173-81.
- Frolov, M. V.; Huen, D. S.; Stevaux, O.; Dimova, D.; Balczarek-Strang, K.; Elsdon, M. and Dyson, N. J. (2001): Functional antagonism between E2F family members, *Genes Dev* (vol. 15), No. 16, pp. 2146-60.
- Furukawa, Y.; Terui, Y.; Sakoe, K.; Ohta, M. and Saito, M. (1994): The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of *cdc2* mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells, *J Biol Chem* (vol. 269), No. 42, pp. 26249-58.
- Garg, R. K. (2003): Acute disseminated encephalomyelitis, *Postgrad Med J* (vol. 79), No. 927, pp. 11-7.
- Gau, D.; Lemberger, T.; von Gall, C.; Kretz, O.; Le Minh, N.; Gass, P.; Schmid, W.; Schibler, U.; Korf, H. W. and Schutz, G. Secondary author (2002): Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock, *Neuron* (vol. 34), No. 2, pp. 245-53.
- Gaubatz, S.; Lindeman, G. J.; Ishida, S.; Jakoi, L.; Nevins, J. R.; Livingston, D. M. and Rempel, R. E. (2000): E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control, *Mol Cell* (vol. 6), No. 3, pp. 729-35.
- Gaubatz, S.; Wood, J. G. and Livingston, D. M. (1998): Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 16, pp. 9190-5.
- Giangrande, P. H.; Hallstrom, T. C.; Tunyaplin, C.; Calame, K. and Nevins, J. R. (2003): Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 11, pp. 3707-20.
- Giangrande, P. H.; Zhu, W.; Rempel, R. E.; Laakso, N. and Nevins, J. R. (2004): Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members, *Embo J* (vol. 23), No. 6, pp. 1336-47. Epub 2004 Mar 4.
- Giangrande, P. H.; Zhu, W.; Schlisio, S.; Sun, X.; Mori, S.; Gaubatz, S. and Nevins, J. R. (2004): A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription, *Genes Dev* (vol. 18), No. 23, pp. 2941-51.
- Gravel, M.; Peterson, J.; Yong, V. W.; Kottis, V.; Trapp, B. and Braun, P. E. (1996): Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination, *Mol Cell Neurosci* (vol. 7), No. 6, pp. 453-66.
- Hafler, D. A. (2004): Multiple sclerosis, *J Clin Invest* (vol. 113), No. 6, pp. 788-94.
- Hagemeier, C.; Cook, A. and Kouzarides, T. (1993): The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro, *Nucleic Acids Res* (vol. 21), No. 22, pp. 4998-5004.
- Hallstrom, T. C. and Nevins, J. R. (2003): Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 19, pp. 10848-53.
- Hao, X. F.; Alphey, L.; Bandara, L. R.; Lam, E. W.; Glover, D. and La Thangue, N. B. (1995): Functional conservation of the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F and its pathway of control in *Drosophila melanogaster*, *J Cell Sci* (vol. 108), No. Pt 9, pp. 2945-54.
- Harvey, M.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A., Jr.; Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993): Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice, *Faseb J* (vol. 7), No. 10, pp. 938-43.
- Helin, K.; Lees, J. A.; Vidal, M.; Dyson, N.; Harlow, E. and Fattaey, A. Secondary author (1992): A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F, *Cell* (vol. 70), No. 2, pp. 337-50.
- Helin, K.; Wu, C. L.; Fattaey, A. R.; Lees, J. A.; Dynlacht, B. D.; Ngwu, C. and Harlow, E. (1993): Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation, *Genes Dev* (vol. 7), No. 10, pp. 1850-61.
- Hertzog, P. J. (2001): Isolation of embryonic fibroblasts and their use in the in vitro characterization of gene function, *Methods Mol Biol* (vol. 158), pp. 205-15.
- Hogan, B.; Beddington, R.; Constantini, F. and Lacy, E. (1994): *Manipulating The Mouse Embryo - A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, New York 11803-2500, USA.

- Hoja, M. R.; Liu, J. G.; Mohammadieh, M.; Kvist, U. and Yuan, L. (2004): E2F1 deficiency impairs murine spermatogenesis and augments testicular degeneration in SCP3-nullizygous mice, *Cell Death Differ* (vol. 11), No. 3, pp. 354-6.
- Hsieh, J. K.; Fredersdorf, S.; Kouzarides, T.; Martin, K. and Lu, X. (1997): E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction, *Genes Dev* (vol. 11), No. 14, pp. 1840-52.
- Hu, N.; Gutsmann, A.; Herbert, D. C.; Bradley, A.; Lee, W. H. and Lee, E. Y. Secondary author (1994): Heterozygous Rb-1 delta 20/+ mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance, *Oncogene* (vol. 9), No. 4, pp. 1021-7.
- Huang, M. T. Secondary author (1993): Gene targeting technology for creating transgenic models of lymphopoiesis, *Lab Anim Sci* (vol. 43), No. 2, pp. 156-9.
- Huet, X.; Rech, J.; Plet, A.; Vie, A. and Blanchard, J. M. (1996): Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 7, pp. 3789-98.
- Humbert, P. O.; Rogers, C.; Ganiatsas, S.; Landsberg, R. L.; Trimarchi, J. M.; Dandapani, S.; Brugnara, C.; Erdman, S.; Schrenzel, M.; Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2000): E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability, *Mol Cell* (vol. 6), No. 2, pp. 281-91.
- Humbert, P. O.; Verona, R.; Trimarchi, J. M.; Rogers, C.; Dandapani, S. and Lees, J. A. (2000): E2f3 is critical for normal cellular proliferation, *Genes Dev* (vol. 14), No. 6, pp. 690-703.
- Hurford, R. K., Jr.; Cobrinik, D.; Lee, M. H. and Dyson, N. Secondary author (1997): pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes, *Genes Dev* (vol. 11), No. 11, pp. 1447-63.
- Ikeda, M. A.; Jakoi, L. and Nevins, J. R. Secondary author (1996): A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 8, pp. 3215-20.
- Imitola, J.; Snyder, E. Y. and Khoury, S. J. (2003): Genetic programs and responses of neural stem/progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis, *Physiol Genomics* (vol. 14), No. 3, pp. 171-97.
- Irwin, M.; Marin, M. C.; Phillips, A. C.; Seelan, R. S.; Smith, D. I.; Liu, W.; Flores, E. R.; Tsai, K. Y.; Jacks, T.; Vousden, K. H. and Kaelin, W. G., Jr. (2000): Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis, *Nature* (vol. 407), No. 6804, pp. 645-8.
- Ishida, S.; Huang, E.; Zuzan, H.; Spang, R.; Leone, G.; West, M. and Nevins, J. R. (2001): Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis, *Mol Cell Biol* (vol. 21), No. 14, pp. 4684-99.
- Ishihara, T.; Hong, M.; Zhang, B.; Nakagawa, Y.; Lee, M. K.; Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1999): Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform, *Neuron* (vol. 24), No. 3, pp. 751-62.
- Ivey-Hoyle, M.; Conroy, R.; Huber, H. E.; Goodhart, P. J.; Oliff, A. and Heimbroke, D. C. Secondary author (1993): Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 12, pp. 7802-12.
- Jacks, T.; Fazeli, A.; Schmitt, E. M.; Bronson, R. T.; Goodell, M. A. and Weinberg, R. A. Secondary author (1992): Effects of an Rb mutation in the mouse, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 295-300.
- Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M. (1999): Cellular memory of transcriptional states by Polycomb-group proteins, *Semin Cell Dev Biol* (vol. 10), No. 2, pp. 227-35.
- Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M. (2002): Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1602), No. 2, pp. 151-61.
- Johnson, D. G.; Schwarz, J. K.; Cress, W. D. and Nevins, J. R. Secondary author (1993): Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase, *Nature* (vol. 365), No. 6444, pp. 349-52.
- Kaelin, W. G., Jr.; Krek, W.; Sellers, W. R.; DeCaprio, J. A.; Ajchenbaum, F.; Fuchs, C. S.; Chittenden, T.; Li, Y.; Farnham, P. J.; Blazar, M. A. and et al., Secondary author (1992): Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties, *Cell* (vol. 70), No. 2, pp. 351-64.
- Kalyani, A.; Hobson, K. and Rao, M. S. (1997): Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis, *Dev Biol* (vol. 186), No. 2, pp. 202-23.
- Karlseder, J.; Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996): Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 4, pp. 1659-67.
- Kaye, E. M. (2001): Update on genetic disorders affecting white matter, *Pediatr Neurol* (vol. 24), No. 1, pp. 11-24.
- Kherrouche, Z.; Begue, A.; Stehelin, D. and Monte, D. (2001): Molecular cloning and characterization of the mouse e2f6 gene, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 288), No. 1, pp. 22-33.
- Knight, J. and Abbott, A. Secondary author (2002): Full house, *Nature* (vol. 417), No. 6891, pp. 785-6.
- Knudson, A. G. (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 1), No. 2, pp. 157-62.

- Kohn, M. J.; Bronson, R. T.; Harlow, E.; Dyson, N. J. and Yamasaki, L. (2003): Dp1 is required for extra-embryonic development, *Development* (vol. 130), No. 7, pp. 1295-305.
- Kovesdi, I.; Reichel, R. and Nevins, J. R. (1987): Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 84), No. 8, pp. 2180-4.
- Kowalik, T. F.; DeGregori, J.; Schwarz, J. K. and Nevins, J. R. Secondary author (1995): E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis, *J Virol* (vol. 69), No. 4, pp. 2491-500.
- Kuehn, M. R.; Bradley, A.; Robertson, E. J. and Evans, M. J. Secondary author (1987): A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice, *Nature* (vol. 326), No. 6110, pp. 295-8.
- Kühn, R.; Rajewsky, K. and Müller, W. (1991): Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice, *Science* (vol. 254), No. 5032, pp. 707-10.
- La Thangue, N. B. (2002): Transcription. Chromatin control--a place for E2F and Myc to meet, *Science* (vol. 296), No. 5570, pp. 1034-5.
- La Thangue, N. B. and Rigby, P. W. (1987): An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells, *Cell* (vol. 49), No. 4, pp. 507-13.
- Lam, E. W. and Watson, R. J. (1993): An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription, *Embo J* (vol. 12), No. 7, pp. 2705-13.
- Larocca, J. N. and Rodriguez-Gabin, A. G. (2002): Myelin biogenesis: vesicle transport in oligodendrocytes, *Neurochem Res* (vol. 27), No. 11, pp. 1313-29.
- Lee, E. Y.; Cam, H.; Ziebold, U.; Rayman, J. B.; Lees, J. A. and Dynlacht, B. D. (2002): E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice, *Cancer Cell* (vol. 2), No. 6, pp. 463-72.
- Lee, E. Y.; Chang, C. Y.; Hu, N.; Wang, Y. C.; Lai, C. C.; Herrup, K.; Lee, W. H. and Bradley, A. Secondary author (1992): Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 288-94.
- Lees, J. A.; Saito, M.; Vidal, M.; Valentine, M.; Look, T.; Harlow, E.; Dyson, N. and Helin, K. Secondary author (1993): The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 12, pp. 7813-25.
- Leone, G.; DeGregori, J.; Yan, Z.; Jakoi, L.; Ishida, S.; Williams, R. S. and Nevins, J. R. (1998): E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase, *Genes Dev* (vol. 12), No. 14, pp. 2120-30.
- Leung, C.; Lingbeek, M.; Shakhova, O.; Liu, J.; Tanger, E.; Saremaslani, P.; Van Lohuizen, M. and Marino, S. (2004): Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas, *Nature* (vol. 428), No. 6980, pp. 337-41.
- Lewis, S. A. and Cowan, N. J. (1988): Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells, *J Cell Biol* (vol. 106), No. 6, pp. 2023-33.
- Li, F. X.; Zhu, J. W.; Hogan, C. J. and DeGregori, J. (2003): Defective gene expression, S phase progression, and maturation during hematopoiesis in E2F1/E2F2 mutant mice, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 10, pp. 3607-22.
- Li, F. X.; Zhu, J. W.; Tessem, J. S.; Beilke, J.; Varella-Garcia, M.; Jensen, J.; Hogan, C. J. and DeGregori, J. (2003): The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 22, pp. 12935-40.
- Lindeman, G. J.; Dagnino, L.; Gaubatz, S.; Xu, Y.; Bronson, R. T.; Warren, H. B. and Livingston, D. M. (1998): A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting, *Genes Dev* (vol. 12), No. 8, pp. 1092-8.
- Lloyd, K. G. (1977): CNS compensation to dopamine neuron loss in Parkinson's disease, *Adv Exp Med Biol* (vol. 90), pp. 255-66.
- Logan, N.; Delavaine, L.; Graham, A.; Reilly, C.; Wilson, J.; Brummelkamp, T. R.; Hijmans, E. M.; Bernards, R. and La Thangue, N. B. (2004): E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains, *Oncogene* (vol. 23), No. 30, pp. 5138-50.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* (vol. 193), No. 1, pp. 265-75.
- Lukas, J.; Herzinger, T.; Hansen, K.; Moroni, M. C.; Resnitzky, D.; Helin, K.; Reed, S. I. and Bartek, J. Secondary author (1997): Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway, *Genes Dev* (vol. 11), No. 11, pp. 1479-92.
- Lukas, J.; Petersen, B. O.; Holm, K.; Bartek, J. and Helin, K. Secondary author (1996): Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 3, pp. 1047-57.

- Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A. (1998): Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 2, pp. 753-61.
- Lyons, A. B. and Parish, C. R. (1994): Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *J Immunol Methods* (vol. 171), No. 1, pp. 131-7.
- Macleod, K. F.; Hu, Y. and Jacks, T. Secondary author (1996): Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system, *Embo J* (vol. 15), No. 22, pp. 6178-88.
- Maiti, B.; Li, J.; de Bruin, A.; Gordon, F.; Timmers, C.; Opavsky, R.; Patil, K.; Tuttle, J.; Cleghorn, W. and Leone, G. (2005): Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J Biol Chem* (vol. 18), p. 18.
- Mann, D. J. and Jones, N. C. Secondary author (1996): E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest, *Curr Biol* (vol. 6), No. 4, pp. 474-83.
- Martin, N.; Jaubert, J.; Gounon, P.; Salido, E.; Haase, G.; Szatanik, M. and Guenet, J. L. (2002): A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice, *Nat Genet* (vol. 32), No. 3, pp. 443-7. Epub 2002 Oct 21.
- McManus, M. T. and Sharp, P. A. Secondary author (2002): Gene silencing in mammals by small interfering RNAs, *Nat Rev Genet* (vol. 3), No. 10, pp. 737-47.
- Mizuguchi, G.; Nakagoshi, H.; Nagase, T.; Nomura, N.; Date, T.; Ueno, Y. and Ishii, S. (1990): DNA binding activity and transcriptional activator function of the human B-myc protein compared with c-MYC, *J Biol Chem* (vol. 265), No. 16, pp. 9280-4.
- Moberg, K.; Starz, M. A. and Lees, J. A. Secondary author (1996): E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 4, pp. 1436-49.
- Molofsky, A. V.; Pardoll, R.; Iwashita, T.; Park, I. K.; Clarke, M. F. and Morrison, S. J. (2003): Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation, *Nature* (vol. 425), No. 6961, pp. 962-7. Epub 2003 Oct 22.
- Monani, U. R.; Sendtner, M.; Covert, D. D.; Parsons, D. W.; Andreassi, C.; Le, T. T.; Jablonka, S.; Schrank, B.; Rossol, W.; Prior, T. W.; Morris, G. E. and Burghes, A. H. (2000): The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy, *Hum Mol Genet* (vol. 9), No. 3, pp. 333-9.
- Morgenbesser, S. D.; Williams, B. O.; Jacks, T. and DePinho, R. A. Secondary author (1994): p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens, *Nature* (vol. 371), No. 6492, pp. 72-4.
- Moritz, K. M.; Lim, G. B. and Wintour, E. M. Secondary author (1997): Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis, *Am J Physiol* (vol. 273), No. 6 Pt 2, pp. R1829-44.
- Morkel, M. (1999): Klonierung und Charakterisierung des E2F-ähnlichen transkriptionellen Repressors EMA, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität, Berlin.
- Morkel, M.; Wenkel, J.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. and Hagemeyer, C. (1997): An E2F-like repressor of transcription, *Nature* (vol. 390), No. 6660, pp. 567-8.
- Morkel, M.; Wenkel, J.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. and Hagemeyer, C. Secondary author (1997): An E2F-like repressor of transcription, *Nature* (vol. 390), No. 6660, pp. 567-8.
- Moroni, M. C.; Hickman, E. S.; Denchi, E. L.; Caprara, G.; Colli, E.; Cecconi, F.; Muller, H. and Helin, K. (2001): Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol* (vol. 3), No. 6, pp. 552-8.
- Morris, E. J. and Dyson, N. J. (2001): Retinoblastoma protein partners, *Adv Cancer Res* (vol. 82), pp. 1-54.
- Mujtaba, T.; Mayer-Proschel, M. and Rao, M. S. (1998): A common neural progenitor for the CNS and PNS, *Dev Biol* (vol. 200), No. 1, pp. 1-15.
- Muller, H.; Bracken, A. P.; Vernell, R.; Moroni, M. C.; Christians, F.; Grassilli, E.; Prosperini, E.; Vigo, E.; Oliner, J. D. and Helin, K. (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis, *Genes Dev* (vol. 15), No. 3, pp. 267-85.
- Müller, H.; Bracken, A. P.; Vernell, R.; Moroni, M. C.; Christians, F.; Grassilli, E.; Prosperini, E.; Vigo, E.; Oliner, J. D. and Helin, K. (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis, *Genes Dev* (vol. 15), No. 3, pp. 267-85.
- Muller, H. and Helin, K. (2000): The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1470), No. 1, pp. M1-12.
- Mulligan, G. J.; Wong, J. and Jacks, T. Secondary author (1998): p130 is dispensable in peripheral T lymphocytes: evidence for functional compensation by p107 and pRB, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 1, pp. 206-20.
- Murga, M.; Fernandez-Capetillo, O.; Field, S. J.; Moreno, B.; Borlado, L. R.; Fujiwara, Y.; Balomenos, D.; Vicario, A.; Carrera, A. C.; Orkin, S. H.; Greenberg, M. E. and Zubiaga, A. M. (2001): Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity, *Immunity* (vol. 15), No. 6, pp. 959-70.

- Nahle, Z.; Polakoff, J.; Davuluri, R. V.; McCurrach, M. E.; Jacobson, M. D.; Narita, M.; Zhang, M. Q.; Lazebnik, Y.; Bar-Sagi, D. and Lowe, S. W. (2002): Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F, *Nat Cell Biol* (vol. 4), No. 11, pp. 859-64.
- Nevins, J. R. (2001): The Rb/E2F pathway and cancer, *Hum Mol Genet* (vol. 10), No. 7, pp. 699-703.
- Nevins, J. R.; DeGregori, J.; Jakoi, L. and Leone, G. (1997): Functional analysis of E2F transcription factor, *Methods Enzymol* (vol. 283), pp. 205-19.
- Norton, W. T. and Poduslo, S. E. (1973): Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation
- Myelination in rat brain: method of myelin isolation, *J Neurochem* (vol. 21), No. 4, pp. 759-73.
- Norton, W. T. and Poduslo, S. E. (1973): Myelination in rat brain: method of myelin isolation, *J Neurochem* (vol. 21), No. 4, pp. 749-57.
- Nossal, G. J. Secondary author (1991): Molecular and cellular aspects of immunologic tolerance, *Eur J Biochem* (vol. 202), No. 3, pp. 729-37.
- Oberley, M. J.; Inman, D. R. and Farnham, P. J. (2003): E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on Lysine 9, *J Biol Chem* (vol. 8), p. 8.
- Ogawa, H.; Ishiguro, K.; Gaubatz, S.; Livingston, D. M. and Nakatani, Y. (2002): A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells, *Science* (vol. 296), No. 5570, pp. 1132-6.
- Ogris, E.; Rotheneder, H.; Mudrak, I.; Pichler, A. and Wintersberger, E. (1993): A binding site for transcription factor E2F is a target for trans activation of murine thymidine kinase by polyomavirus large T antigen and plays an important role in growth regulation of the gene, *J Virol* (vol. 67), No. 4, pp. 1765-71.
- Ohtani, K.; DeGregori, J. and Nevins, J. R. (1995): Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 26, pp. 12146-50.
- Ohtani, K. and Nevins, J. R. (1994): Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 3, pp. 1603-12.
- Palena, A.; Mangiacasale, R.; Magnano, A. R.; Barberi, L.; Giordano, R.; Spadafora, C. and Lavia, P. (2000): E2F transcription factors are differentially expressed in murine gametes and early embryos, *Mech Dev* (vol. 97), No. 1-2, pp. 211-215.
- Palis, J. and Segel, G. B. Secondary author (1998): Developmental biology of erythropoiesis, *Blood Rev* (vol. 12), No. 2, pp. 106-14.
- Palmiter, R. D.; Brinster, R. L.; Hammer, R. E.; Trumbauer, M. E.; Rosenfeld, M. G.; Birnberg, N. C. and Evans, R. M. Secondary author (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, *Nature* (vol. 300), No. 5893, pp. 611-5.
- Pearson, B. E.; Nasheuer, H. P. and Wang, T. S. (1991): Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells, *Mol Cell Biol* (vol. 11), No. 4, pp. 2081-95.
- Pearson, H. (2002): Surviving a knockout blow, *Nature* (vol. 415), No. 6867, pp. 8-9.
- Phillips, A. C.; Bates, S.; Ryan, K. M.; Helin, K. and Vousden, K. H. (1997): Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1, *Genes Dev* (vol. 11), No. 14, pp. 1853-63.
- Pirrotta, V. (1998): Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing, *Cell* (vol. 93), No. 3, pp. 333-6.
- Pohlars, M.; Truss, M.; Frede, U.; Scholz, A.; Strehle, M.; Kuban, R.-J.; Hoffmann, B.; Morkel, M.; Birchmeier, C. and Hagemeyer, C. (2005): A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression, *Curr Biol* (vol. 15), pp. 1051-57.
- Pomerantz, J.; Schreiber-Agus, N.; Liegeois, N. J.; Silverman, A.; Alland, L.; Chin, L.; Potes, J.; Chen, K.; Orlow, I.; Lee, H. W.; Cordon-Cardo, C. and DePinho, R. A. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53, *Cell* (vol. 92), No. 6, pp. 713-23.
- Qin, X. Q.; Livingston, D. M.; Kaelin, W. G., Jr. and Adams, P. D. Secondary author (1994): Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 23, pp. 10918-22.
- Quelle, D. E.; Zindy, F.; Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest, *Cell* (vol. 83), No. 6, pp. 993-1000.
- Ramirez-Solis, R.; Liu, P. and Bradley, A. Secondary author (1995): Chromosome engineering in mice, *Nature* (vol. 378), No. 6558, pp. 720-4.
- Readhead, C.; Schneider, A.; Griffiths, I. and Nave, K. A. (1994): Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage, *Neuron* (vol. 12), No. 3, pp. 583-95.
- Reichardt, H. M.; Kaestner, K. H.; Tuckermann, J.; Kretz, O.; Wessely, O.; Bock, R.; Gass, P.; Schmid, W.; Herrlich, P.; Angel, P. and Schutz, G. Secondary author (1998): DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival, *Cell* (vol. 93), No. 4, pp. 531-41.

- Reid, E. (2003): Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias, *J Med Genet* (vol. 40), No. 2, pp. 81-6.
- Rempel, R. E.; Saenz-Robles, M. T.; Storms, R.; Morham, S.; Ishida, S.; Engel, A.; Jakoi, L.; Melhem, M. F.; Pipas, J. M.; Smith, C. and Nevins, J. R. (2000): Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages, *Mol Cell* (vol. 6), No. 2, pp. 293-306.
- Ren, B.; Cam, H.; Takahashi, Y.; Volkert, T.; Terragni, J.; Young, R. A. and Dynlacht, B. D. (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints, *Genes Dev* (vol. 16), No. 2, pp. 245-56.
- Robertson, E. J. (1987): Embryo-derived stem cell lines., In *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. Robertson, eds. (Oxford: IRL Press) p. 71-112.
- Sage, J.; Miller, A. L.; Perez-Mancera, P. A.; Wysocki, J. M. and Jacks, T. (2003): Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry, *Nature* (vol. 424), No. 6945, pp. 223-8.
- Sage, J.; Mulligan, G. J.; Attardi, L. D.; Miller, A.; Chen, S.; Williams, B.; Theodorou, E. and Jacks, T. Secondary author (2000): Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization, *Genes Dev* (vol. 14), No. 23, pp. 3037-50.
- Sawado, T.; Yamaguchi, M.; Nishimoto, Y.; Ohno, K.; Sakaguchi, K. and Matsukage, A. (1998): dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 251), No. 2, pp. 409-15.
- Schlisio, S.; Halperin, T.; Vidal, M. and Nevins, J. R. (2002): Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function, *Embo J* (vol. 21), No. 21, pp. 5775-86.
- Schmalbruch, H.; Jensen, H. J.; Bjaerg, M.; Kamieniecka, Z. and Kurland, L. (1991): A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy, *J Neuropathol Exp Neurol* (vol. 50), No. 3, pp. 192-204.
- Schneider, J. W.; Gu, W.; Zhu, L.; Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. Secondary author (1994): Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells, *Science* (vol. 264), No. 5164, pp. 1467-71.
- Schulze, A.; Zeffass, K.; Spitkovsky, D.; Middendorp, S.; Berges, J.; Helin, K.; Jansen-Durr, P. and Henglein, B. (1995): Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 24, pp. 11264-8.
- Schwarz, J. K.; Bassing, C. H.; Kovesdi, I.; Datto, M. B.; Blazing, M.; George, S.; Wang, X. F. and Nevins, J. R. Secondary author (1995): Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 2, pp. 483-7.
- Sedlarz, P. (2004): Vergleich der Funktionen und DNS-Bindungseigenschaften von E2F1 und E2F6/EMA, Medizinische Fakultät, Universitätsmedizin Berlin, Berlin.
- Shan, B. and Lee, W. H. Secondary author (1994): Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 12, pp. 8166-73.
- Shan, B.; Zhu, X.; Chen, P. L.; Durfee, T.; Yang, Y.; Sharp, D. and Lee, W. H. Secondary author (1992): Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F, *Mol Cell Biol* (vol. 12), No. 12, pp. 5620-31.
- Sherr, C. J. (2001): The INK4a/ARF network in tumour suppression, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 2), No. 10, pp. 731-7.
- Sherr, C. J. (2004): Principles of tumor suppression, *Cell* (vol. 116), No. 2, pp. 235-46.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev* (vol. 13), No. 12, pp. 1501-12.
- Slansky, J. E. and Farnham, P. J. Secondary author (1996): Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation, *Curr Top Microbiol Immunol* (vol. 208), pp. 1-30.
- Song, J.; O'Connor L, T.; Yu, W.; Baas, P. W. and Duncan, I. D. (1999): Microtubule alterations in cultured taiep rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation, *J Neurocytol* (vol. 28), No. 8, pp. 671-83.
- Sonnenberg-Riethmacher, E.; Walter, B.; Riethmacher, D.; Godecke, S. and Birchmeier, C. (1996): The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis, *Genes Dev* (vol. 10), No. 10, pp. 1184-93.
- Storre, J.; Elsasser, H. P.; Fuchs, M.; Ullmann, D.; Livingston, D. M. and Gaubatz, S. (2002): Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6, *EMBO Rep* (vol. 3), No. 7, pp. 695-700.
- Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A. (2000): *Xenopus* embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis, *Mol Cell* (vol. 5), No. 2, pp. 217-29.
- Takahashi, Y.; Rayman, J. B. and Dynlacht, B. D. (2000): Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression, *Genes Dev* (vol. 14), No. 7, pp. 804-16.
- Thomas, K. R.; Folger, K. R. and Capecchi, M. R. (1986): High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome, *Cell* (vol. 44), pp. 419-428.

- Tommasi, S. and Pfeifer, G. P. (1995): In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 12, pp. 6901-13.
- Trimarchi, J. M.; Fairchild, B.; Verona, R.; Moberg, K.; Andon, N. and Lees, J. A. (1998): E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 6, pp. 2850-5.
- Trimarchi, J. M.; Fairchild, B.; Wen, J. and Lees, J. A. (2001): The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 4, pp. 1519-1524.
- Trimarchi, J. M. and Lees, J. A. (2002): Transcription sibling rivalry in the e2f family, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 3), No. 1, pp. 11-20.
- Trouche, D. and Kouzarides, T. (1996): E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 4, pp. 1439-42.
- Tsai, K. Y.; Hu, Y.; Macleod, K. F.; Crowley, D.; Yamasaki, L. and Jacks, T. (1998): Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos, *Mol Cell* (vol. 2), No. 3, pp. 293-304.
- van der Lugt, N. M.; Domen, J.; Linders, K.; van Roon, M.; Robanus-Maandag, E.; te Riele, H.; van der Valk, M.; Deschamps, J.; Sofroniew, M.; van Lohuizen, M. and et al. (1994): Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene, *Genes Dev* (vol. 8), No. 7, pp. 757-69.
- van Lohuizen, M. (1998): Functional analysis of mouse Polycomb group genes, *Cell Mol Life Sci* (vol. 54), No. 1, pp. 71-9.
- Villasante, A.; Wang, D.; Dobner, P.; Dolph, P.; Lewis, S. A. and Cowan, N. J. (1986): Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isoforms: testis-specific expression of two sister genes, *Mol Cell Biol* (vol. 6), No. 7, pp. 2409-19.
- Viney, J. L. Secondary author (1994): Transgenic and knockout models for studying diseases of the immune system, *Curr Opin Genet Dev* (vol. 4), No. 3, pp. 461-5.
- Wang, P. J.; McCarrey, J. R.; Yang, F. and Page, D. C. (2001): An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia, *Nat Genet* (vol. 27), No. 4, pp. 422-6.
- Watson, D. F.; Nachtman, F. N.; Kunkel, R. W. and Griffin, J. W. (1994): Altered neurofilament phosphorylation and beta tubulin isoforms in Charcot-Marie-Tooth disease type 1, *Neurology* (vol. 44), No. 12, pp. 2383-7.
- Weinmann, A. S.; Yan, P. S.; Oberley, M. J.; Huang, T. H. and Farnham, P. J. (2002): Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis, *Genes Dev* (vol. 16), No. 2, pp. 235-44.
- Williams, B. O.; Remington, L.; Albert, D. M.; Mukai, S.; Bronson, R. T. and Jacks, T. Secondary author (1994): Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53, *Nat Genet* (vol. 7), No. 4, pp. 480-4.
- Williamson, T. L. and Cleveland, D. W. (1999): Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons, *Nat Neurosci* (vol. 2), No. 1, pp. 50-6.
- Wu, L.; Timmers, C.; Maiti, B.; Saavedra, H. I.; Sang, L.; Chong, G. T.; Nuckolls, F.; Giangrande, P.; Wright, F. A.; Field, S. J.; Greenberg, M. E.; Orkin, S.; Nevins, J. R.; Robinson, M. L. and Leone, G. (2001): The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation, *Nature* (vol. 414), No. 6862, pp. 457-62.
- Wu, X. and Levine, A. J. Secondary author (1994): p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 9, pp. 3602-6.
- Yamasaki, L. (1999): Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the Goldilocks theory of E2F/DP action, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1423), No. 2, pp. M9-15.
- Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E. and Dyson, N. J. (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1, *Cell* (vol. 85), No. 4, pp. 537-48.
- Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E. and Dyson, N. J. Secondary author (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1, *Cell* (vol. 85), No. 4, pp. 537-48.
- Yan, Z.; DeGregori, J.; Shohet, R.; Leone, G.; Stillman, B.; Nevins, J. R. and Williams, R. S. (1998): Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 7, pp. 3603-8.
- Yee, A. S.; Reichel, R.; Kovacs, I. and Nevins, J. R. (1987): Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex, *Embo J* (vol. 6), No. 7, pp. 2061-8.
- Yin, X.; Peterson, J.; Gravel, M.; Braun, P. E. and Trapp, B. D. (1997): CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction, *J Neurosci Res* (vol. 50), No. 2, pp. 238-47.

-
- Zhang, Y.; Xiong, Y. and Yarbrough, W. G. (1998): ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways, *Cell* (vol. 92), No. 6, pp. 725-34.
- Zheng, N.; Fraenkel, E.; Pabo, C. O. and Pavletich, N. P. (1999): Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP, *Genes Dev* (vol. 13), No. 6, pp. 666-74.
- Zhou, Q. and Anderson, D. J. (2002): The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification, *Cell* (vol. 109), No. 1, pp. 61-73.
- Zhu, J. W.; Field, S. J.; Gore, L.; Thompson, M.; Yang, H.; Fujiwara, Y.; Cardiff, R. D.; Greenberg, M.; Orkin, S. H. and DeGregori, J. (2001): E2F1 and E2F2 Determine Thresholds for Antigen-Induced T-Cell Proliferation and Suppress Tumorigenesis, *Mol Cell Biol* (vol. 21), No. 24, pp. 8547-64.
- Zhu, W.; Giangrande, P. H. and Nevins, J. R. (2004): E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription, *Embo J* (vol. 28), p. 28.
- Ziebold, U.; Lee, E. Y.; Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2003): E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 18, pp. 6542-52.
- Ziebold, U.; Reza, T.; Caron, A. and Lees, J. A. (2001): E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos, *Genes Dev* (vol. 15), No. 4, pp. 386-91.
- Zindy, F.; Eischen, C. M.; Randle, D. H.; Kamijo, T.; Cleveland, J. L.; Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (1998): Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization, *Genes Dev* (vol. 12), No. 15, pp. 2424-33.

Abkürzungsverzeichnis

Die Liste der verwendeten Abkürzungen ist ausschließlich der SI-Einheiten und chemischen Formeln.

| | |
|-------------------------------|---|
| %/V | Prozent pro Volumen |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Antigen-präsentierende Zellen, <i>antigen presenting cells</i> |
| aqua bidest. | <i>aqua bidestillata</i> |
| BES | <i>N,N</i> -bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure |
| bp | Basenpaare |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Desoxyuridin |
| BSA | <i>bovine serum albumine</i> |
| cDNA | zur mRNA komplementäre DNA |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| CNP | 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DRFZ | Deutsches Rheumaforschungszentrum |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| Ed | Embryonaltag |
| EMA | EMA/E2F-6 |
| EMA/E2F-6 ^{-/-} , mS | symptomatische EMA/E2F-6 ^{-/-} -Mäuse |
| EMA/E2F-6 ^{-/-} , oS | nichtsymptomatische EMA/E2F-6 ^{-/-} -Mäuse |
| ES-Zelle | embryonale Stammzelle |
| FBS | <i>Fetal Bovine Serum</i> |
| FITC | Fluoreszin-Isothiocyanat |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo-Dalton |
| MEF | embryonale Mausfibroblasten |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid |
| NCSC | neurale Crest-Stammzellen, <i>neural crest stem cells</i> |
| <i>neo</i> | Transkriptionseinheit der Neomycinphosphotransferase |
| NSC | neurale Stammzellen, <i>neural stem cells</i> |
| nt | Nukleotide |
| OPC | Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, <i>oligodendrocyte progenitor cells</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphat buffered saline</i> |
| p. c. | <i>post coitum</i> |
| Pc-G | Polycomb-Gruppe |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PJ | Propidium-Jodid |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| pRb | Retinoblastomprotein |
| RPA | <i>RNase Protection Assay</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute, <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| Stabw | Standardabweichung, ausgehend von einer Stichprobe |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| UTR | nichttranslatierter Bereich, <i>untranslated region</i> |
| Wt | Wildtyp |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind als Zeitschriftenartikel erschienen bzw. in Vorbereitung:

Pohlers, M., Truss, M., Frede, U., Scholz, A., Strehle, M., Kuban, R.-J., Hoffmann, B., Morkel, M., Birchmeier, C., and Hagemeyer, C. (2005) A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression. *Curr Biol*, 15, 1051-1057.

Pohlers, M., van Landeghem, F., von Deimling, A, and Hagemeyer, C. (2005) Analysis of E2F6 deficient mice. *Manuscript in Vorbereitung*.

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbstständig unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfen angefertigt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

verheiratet, zwei Kinder

Grundwehrdienst Juli 1991 – Juni 1992

Schulbildung:

Sept. 1979 – Aug. 1989 10-klassige Polytechnische Oberschule in Karl-Marx-Stadt

Sept. 1989 – Juni 1991 Erweiterte Oberschule (Abitur) in Chemnitz

Universitäre Ausbildung:

Okt. 1992 – Sept. 1994 Grundstudium der Biologie an der Universität Leipzig

Okt. 1994 – Mai 1998 Hauptstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin
(Hauptfach: Molekularbiologie, Nebenfächer: Genetik und Mikrobiologie)

April 1995 – Sept. 1996 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Genetik von Prof. Dr. T. Börner,
Mitarbeit an einem Projekt über die nichtribosomale Proteinsynthese in Cyano-
bakterien

Juli 1996 – Sept. 1996 Studienjahresarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. M.
Strauss: „Nachweis von p53-regulierten Genen in der Leber von Mus musculus“

Juli 1997 – Mai 1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. M. Strauss,
Betreuung durch Dr. A. Heder: „Analyse der pRb-abhängigen Regulation des
humanen Thrombospondin-1-Promotors“

seit Okt. 1998 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. C. Hagemeier, Labor für
Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin

Danksagung

An erster Stelle möchte Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Hagemeyer für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, die stetige Unterstützung des Projekts und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Prof. Dr. Birchmeier-Kohler vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Labor die EMA/E2F-6-mutierten Mauslinien etablieren zu können und die ausgesprochen gute Zusammenarbeit. Mein ausdrücklicher Dank gilt folgenden Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe: Herrn Dr. Michael Strehle danke ich für die Anleitung und Hilfe bei der Generierung der mutierten ES-Zellklone. Ich danke ihm außerdem für seine ständige Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Hinweise. Ich danke Frau Cathrin Rudolf für die Anleitung und Hilfe bei der Generierung der chimären Mäuse. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Alistair Garratt für die Unterstützung bei den Untersuchungen des neuropathologischen Phänotyps der Mäuse.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Truß für die kontinuierliche kritische Auseinandersetzung mit dem Projekt und die alltägliche methodische Beratung. Herrn Dr. Lüder Wiebusch und Frau Dr. Jasmin Asmar danke ich für die Einweisung in die FACS-Analyse. Weiter möchte ich Frau Diplom-Biologin Bettina Hoffmann für ihre Unterstützung im Labor, besonders bei der Genotypanalyse der Mäuse, danken. Frau Annett Rexin danke ich für die Mitarbeit bei der Mäusepflege und Frau Ute Frede für das Überlassen von Abbildungen für diese Dissertation.

Ich danke Herrn Oberarzt Dr. Frank van Landeghem und Herrn Prof. Dr. von Deimling von Institut für Neuropathologie der Charité für die Kooperation bei der Analyse des neuropathologischen Phänotyps der Mäuse. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Schweizer vom Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité für die Ausleihe des Rota-Rod-Gerätes.

Ich danke Frau Fernahl für die zügige Anfertigung und den Herren Prof. Dr. Veit Krenn und Dr. Morawietz vom Institut für Pathologie der Charité für die Unterstützung bei der Beurteilung der histologischen Präparate. Herrn Prof. Dr. Dr. Kulozik von der Universitätskinderklinik Heidelberg danke ich für die Hilfe bei der Erstellung des Differentialblutbildes.

Ich danke Herrn Dr. Maurus dela Rosa und Herrn Dr. Alexander Scheffold vom Deutschen Rheumaforschungszentrum für die Kooperation bei der Analyse der Lymphozyten. Herrn Dr. Georg Schwabe vom Max-Planck-Institut für Genetik danke ich für die Einweisung in die Skelettpräparation.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Nagel von der Zentralen Tierversuchseinrichtung der Charité für sein Engagement bei der Unterbringung der Mäuse und die tierexperimentelle Beratung danken. Ich danke den Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die Pflege der Mäuse.

Meiner Frau danke ich nicht zuletzt für ihre Geduld.